

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1920-1921. — N° 1

Contribution à l'étude

DES

Ferments solubles oxydants directs

RÉACTIONS OXYDASIQUES ET BRUNISSEMENT DE LA POMME

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 16 Juillet 1921

POUR OBTENIR LE DIPLOME SUPÉRIEUR DE PHARMACIEN DE 1^{RE} CLASSE

PAR

M^{LLE} BARRIER

Née le 18 Septembre 1883, à Panissage (Isère)



LYON

IMPRIMERIE EXPRESS

46, rue de la Charité, 46

—
1921

Contribution à l'étude
DES
Ferments solubles oxydants directs

RÉACTIONS OXYDASIQUES ET BRUNISSEMENT DE LA POMME

PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen honoraire.....	M. HUGOUNENQ.
Doyen	MM. J. LEPINE.
Assesseur	ROQUE.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. AUGAGNEUR, SOULIER, CAZENEUVE, BEAUVISAGE,
LACASSAGNE, TESTUT.

PROFESSEURS

Cliniques médicales	}	MM. TEISSIER
Cliniques chirurgicales		ROQUE
Clinique obstétricale et Accouchements.....		BARD
Clinique ophtalmologique		TIXIER
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques.....		BERARD
Clinique neurologique et psychiatrique.....		X...
Clinique des maladies des enfants.....		ROLLET
Clinique des maladies des femmes.....		NICOLAS
Clinique d'oto-rhino-laryngologie		LEPINE (J.)
Clinique des maladies des voies urinaires.....		WEILL
Clinique chirurgicale des maladies des enfants.....		POLLOSSON (A.)
Physique biologique, Radiologie et Physiothérapie.....		LANNOIS
Chimie biologique		ROCHET
Chimie organique et Toxicologie.....		NOVE-JOSSERAND
Matière médicale et Botanique.....		CLUZET
Parasitologie et Histoire naturelle médicale.....		HUGOUNENQ
Anatomie		MOREL
Anatomie générale et Histologie.....		MOREAU
Physiologie		GUIART
Pathologie interne		LATARJET
Pathologie et Thérapeutique générales.....		POLICARD
Anatomie pathologique		DOYON
Médecine opératoire		COLLET
Médecine expérimentale et comparée.....		MOURIQUAND
Médecine légale		PAVIOT
Hygiène		VILLARD
Thérapeutique		ARLOING (F.)
Pharmacologie		Etienne MARTIN
		COURMONT (P.)
		PIC
		FLORENCE (A.)

PROFESSEURS TITULAIRES, SANS CHAIRE

Chargé d'un cours de Pathologie externe.....	VALLAS
— — — Propédeutique de gynécologie.....	CONDAMIN
— — — Chimie minérale.....	BARRAL
— — — Accouchements	COMMANDEUR
— — — Urologie	GAYET

CHARGES DE COURS COMPLEMENTAIRES

Embryologie	HOVELACQUE
Anatomie topographique.....	PATEL
Botanique	BRETIN
Stomatologie	TELLIER

AGREGES

MM.	MM.	MM.	MM.
NOGIER	SAVY	HOVELACQUE	ROUBIER
BRETIN	FROMENT	TRILLAT	FAVRE
LERICHE	THEVENOT (Lucien)	SARVONAT	MURARD
THEVENOT (Léon)	PIERY	FLORENCE (G.)	BONNET
TAVERNIER	COTTE	ROCHAIX	GRAVIER, chargé des
CADE	DUROUX	CORDIER	fonctions.
GARIN			

M. BAYLE, secrétaire.

EXAMINATEURS DE LA THESE

M. MOREL, Président; M. HUGOUNENQ, Assesseur;
MM. MOREAU et BRETIN, Agrégés.

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend leur donner ni approbation ni improbation.

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

Année scolaire 1920-1921. — N° 1

Contribution à l'étude

DES

Ferments solubles oxydants directs

RÉACTIONS OXYDASIQUES ET BRUNISSEMENT DE LA POMME

THÈSE

PRÉSENTÉE

A LA FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE LYON

et soutenue publiquement le 16 Juillet 1921

POUR OBTENIR LE DIPLOME SUPÉRIEUR DE PHARMACIEN DE 1^{RE} CLASSE

PAR

M^{LLE} BARRIER

Née le 18 Septembre 1883, à Panissage (Isère)



LYON

IMPRIMERIE EXPRESS

46, rue de la Charité, 46

—
1921

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MOREL

Professeur de Chimie organique
Chevalier de la Légion d'honneur

Sa conviction ardente de l'impérieuse
nécessité d'un labeur scientifique in-
tense entraîne et anime tous ceux qui
travaillent à ses côtés. Nous le remer-
cions vivement de nous avoir admise
parmi ceux-là.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR HUGOUNENQ

Professeur de Chimie médicale
Doyen honoraire de la Faculté de Médecine et de Pharmacie
Officier de la Légion d'honneur

Hommage respectueux.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR MOREAU

Professeur de Matière médicale

A MONSIEUR LE PROFESSEUR AGRÉGÉ BRETIN



Digitized by the Internet Archive
in 2026

TABLE DES MATIERES

Introduction	13
--------------------	----

PREMIERE PARTIE

Des ferments solubles oxydants directs ou oxydases

Définitions	17
-------------------	----

DÉFINITIONS DES OXYDASES. — Définitions de MM. Duclaux, Bach, de Stœcklin, Guilleminot.

DÉFINITIONS DES PEROXYDIASTASES. — Définitions de MM. de Stœcklin, Bach, J. Wolff, Weyl. — Parallèle entre les oxydases et les peroxydiastases. — Non nécessité de la présence des peroxydes pour expliquer le fonctionnement des peroxydiastases (travaux de J. Wolff).

DÉFINITIONS DE LA CATALASE. — Définitions de MM. Chodat, Bach et J. Wolff.

Réactifs généraux des ferments solubles oxydants directs	25
--	----

RÉACTIFS DU PREMIER GROUPE :

Teinture récente de résine de gayac, émulsion de résine de gayac, solution aqueuse de gayacol, d'hydroquinone, de pyrogallol, réactif Röhmann et Spitzer. Recherche exacte des oxydases, procédé G. Bertrand et Thomas.

RÉACTIFS DU DEUXIÈME GROUPE.

RÉACTIFS MICROCHIMIQUES DES OXYDASES :

Solution de pyrogallol saccharosée, réactif de Röhmann et Spitzer.

Extraction des ferments solubles oxydants directs...	35
--	----

Constitution chimique des ferments solubles oxydants directs.....	37
---	----

PREMIÈRE THÉORIE : *Les oxydases sont des composés métalliques*.....

Travaux analytiques : Travaux de MM. G. Bertrand, Sarthou, Cantacuzène. — Objections de MM. Bach, Chodat, de Stœcklin, Van der Haar, Rosenfeld.

Travaux de synthèse : Travaux de MM. Trillat, J. Wolff, Job, Dony-Hénault, J. Wolff et de Stœcklin. — Travaux de MM. Cossa et Fouard.

DEUXIÈME THÉORIE : *Les oxydases ne sont pas des composés métalliques*.....

Opinions de MM. Spitzer, Effront, Chodat et Bach. Woker (Mme). — Travaux de MM. Berthelot, Bougault et Robin.

Mécanisme de l'action des ferments solubles oxydants directs.....

47

Théorie de M. G. Bertrand. — Objection de M. Bach. — Théorie des oxydases peroxydes. — Objections de MM. Lœw et Pfeffer, Aso, J. Wolff. — Théorie des oxydases : systèmes oxygénase-peroxydase. — Théorie de M. Dony-Hénault. — Théorie de MM. J. Wolff et de Stœcklin. — Théorie de Mme Woker. — Objection de M. Bach. — Théorie de Traube. — Théorie de M. Battelli et Mlle Stern. — Opinions de MM. Weyl et Effront sur le mécanisme de l'oxydation effectuée par les ferments solubles oxydants directs.

Influence de divers agents physiques et chimiques...

63

I. — INFLUENCE DES AGENTS PHYSIQUES.....

64

Chaleur, viscosité, lumière.

II. — INFLUENCE DE DIVERS AGENTS CHIMIQUES....

66

1° *Influence des acides.*

Dose mortelle. — Mécanisme de l'action des acides.

2° *Influence des alcalis.*

3° *Influence de divers sels.*

Rôle nécessaire, paralysant ou activant. — Influence des sels sur les oxydases de synthèse. — Caractères communs des sels activateurs. — Relation entre l'hydrolyse d'un sel et son influence sur les phénomènes oxydasiques : travaux de M. Bach et Mlle Maryanovitch, de M. J. Wolff. — Relation entre la masse d'un sel et son action. — Mécanisme de l'action des sels : théorie de l'existence des prodiastases, théorie de la nature colloïdale des diastases, théorie de M. Bach, théorie de l'action des ions sur le substratum de transformation, théorie de MM. J. Wolff et de Stœcklin. — Action des sels sur les produits de la réaction oxydasique.

Corps transformés par les ferments solubles oxydants directs.....

75

Principales oxydases végétales et animales.....

77

I. — OXYDASES VÉGÉTALES.....

77

Laccase.....

77

Historique. — Préparation. — Composition chimique de la laccase d'après M. G. Bertrand ; objections de M. Dony-Hénault. — Facteur essentiel des oxydations dues à la laccase. — Corps oxydés par la laccase. — Influence de divers agents : chaleur, acides, eau oxygénée. — Rôle de la laccase.

<i>Tyrosinase</i>	84
Historique. — Répartition dans le règne végétal et animal. — Préparation : procédé G. Bertrand et Muttermilch, procédé Staub. — Constitution de la tyrosinase : opinions de MM. Bach, Gonnermann, Haehn. — Influence de la tyrosinase sur la tyrosine, les corps voisins de la tyrosine, les acides aminés, les polypeptides à tyrosine, les polypeptides en présence, de p-crésol, l'indol en présence de p-crésol, les anhydrides cycliques de la tyrosine, la peptone de Witte, la gélatine et l'albumine, les amines aromatiques et les phénols. — Réactifs de la tyrosinase : tyrosine et crésols. — Influence de divers agents sur la tyrosinase : chaleur, temps, lumière, eau oxygénée, acides et anhydride carbonique, phosphates alcalins bibasiques. — Système chimique à pouvoir oxydant analogue à celui de la tyrosinase : <i>tannate de fer-eau oxygénée</i> .	
SYNTHÈSE DE LA TYROSINASE à l'aide des oxydases type laccase et du système peroxydiastase-eau oxygénée. — Sérum antioxydasique polyvalent préventif et curatif. — Rôle de la tyrosinase : rôle chimique et rôle physiologique.	
<i>Schinoxidase</i>	112
<i>Ferments solubles oxydants des champignons</i> ..	112
Ce qu'on désigne sous ce nom. — Répartition de ces ferments. — Influence de la chaleur, du temps, de la réaction du milieu et du phosphate disodique. — Oxydation de la vanilline, du thymol et de la morphine.	
<i>Oxydases de la gomme arabique</i>	116
Travaux de Bourquelot. — Action sur la vanilline, le pyramidon, le camphorate de pyramidon.	
<i>Énoxydase</i> . — <i>Maloxydases</i> . — <i>Spermase</i> . — <i>Oxydases des végétaux supérieurs</i> . — <i>O. des bactéries</i> . — <i>O. des levures</i>	117
II. — OXYDASES ANIMALES	120
Recherche et identification des oxydases animales.	120
<i>Oxydase du leucocyte</i> : Travaux de M. Portier.	121
<i>Luciférase de R. Dubois</i>	122
<i>Alcoolase ou alcooloxydase</i>	122
Localisation. — Recherche. — Préparation. — Propriétés. — L'alcooloxydase est-elle une diastase unique ou un mélange de plusieurs diastases ?	
<i>Uricoxydase</i>	124
Uricoxydase et « ferment uricolytique ». — Localisation. — Absence d'uricoxydase dans les tissus de l'homme. — Détermination de la teneur d'un tissu en uricoxydase.	
<i>Aldéhydase ou salicylase</i>	127
Constatacion de la production dans les tissus animaux d'acide salicylique au dépens de l'aldéhyde correspondant. — Objection de M. G. Bertrand. — Recherches de Medwedew, d'Abelous et Aloy. — Objections de M. Bach. — Travaux de M. Battelli et de Mlle Stern. — Recherches de M. Dony-Hénault et de Mlle Van Duuren. — La salicylase n'est pas une oxydase.	

<i>Rôle physiologique des oxydases</i>	130
Intervention dans la production de composés organiques animaux et végétaux — dans la défense de l'organisme — dans les combustions organiques.	
<i>Conclusions</i>	133

DEUXIEME PARTIE

Réactions oxydasiques et brunissement de la pomme

I. — **Etat des questions d'après les travaux antérieurs.**

<i>Premier travail attirant l'attention sur le brunissement des tranches, du suc et de la pulpe de pomme. — Hypothèse de l'intervention d'une diastase oxydante.</i>	
— <i>Travaux de M. Lindet</i>	135
<i>Recherches de M. J. Ewart</i>	138
— <i>de Mme Wheldale Onslow</i>	140
— <i>de M. J. Wolff</i>	141
<i>Conclusions</i>	141

II. — **Recherches personnelles.**

PRODUCTION, A L'AIDE DE RÉACTIFS AJOUTÉS A LA POMME, de quelques-unes des réactions attribuées aux oxy- dases	143
LOCALISATION de l'oxydase dans le fruit.....	145
TENTATIVES D'EXTRACTION DE L'OXYDASE.....	145
PRODUCTION, AUX DÉPENS D'UNE SUBSTANCE contenue dans la pomme, d'une réaction ayant pour témoin un changement de couleur du mésocarpe et du suc.	153
INFLUENCE DE DIVERS AGENTS PHYSIQUES sur le bleuisse- ment de la pomme avec la teinture de gayac et sur son brunissement à l'air.....	154
INFLUENCE DE DIVERS AGENTS CHIMIQUES (solutions aqueuses d'électrolytes.....	158
Influence d'acides minéraux et organiques en solutions aqueuses; — d'alcalis en solutions aqueuses; — de divers sels alcalins et alcalino-terreux; — de sels appartenant au groupe des antisepti- ques métalliques; — des fluorures et des oxalates.	
DOSAGE DU CALCIUM dans les cendres.....	162
DOSAGE DU MANGANÈSE dans les cendres.....	163
DOSAGE DU FER dans les cendres.....	163

INFLUENCE DE DIVERSES VAPEURS A FROID et en présence d'air atmosphérique.....	168
INFLUENCE DE DIVERSES VAPEURS SATURANTES A FROID, dans de l'air raréfié.....	172
INFLUENCE DE QUELQUES VAPEURS A LA TEMPÉRATURE D'ÉBULLITION des liquides générateurs.....	174
INFLUENCE, SUR LE BRUNISSEMENT, de la mastication prolongée et de l'imprégnation par la salive.....	175
INFLUENCE, SUR LE BRUNISSEMENT, du passage à travers les voies digestives d'un animal.....	175
DU RÔLE DE L'OXYGÈNE DANS LE BRUNISSEMENT :	175
1° Influence d'un vide correspondant à une pression d'environ 10 mm. de mercure et maintenue pendant un temps limité.	
2° Influence d'un vide correspondant à une pression de 6 à 7. m/m. de mercure et maintenue pendant un temps limité.	
3° Influence d'un vide très poussé et soutenu pendant 24 heures.	
DE L'INFLUENCE, SUR LE BRUNISSEMENT, DE L'OXYGÈNE PUR à la température ordinaire.....	182
DE L'INFLUENCE COMBINÉE DU VIDE ET DE L'HYDROGÈNE, du vide et de l'anhydride carbonique, sur le brunissement	182
DE L'INFLUENCE DE QUELQUES RÉDUCTEURS sur le brunissement et la matière brune produite.....	183
Solutions aqueuses d'hydrosulfite de soude, de sulfite de soude, hydrogène naissant.	
INFLUENCE DU BRUNISSEMENT sur l'acidité de la pomme.	184
INFLUENCE DU BRUNISSEMENT sur la teneur en sucres réducteurs de la pomme.....	185
NATURE DU TANIN contenu dans la pomme.....	186
LOCALISATION DE CE TANIN	188
CONCLUSIONS	189
Reproduction du coupe-pomme.....	192
Bibliographie	193
Abréviations	205

INTRODUCTION

Depuis une trentaine d'années, les ferments solubles oxydants directs ou oxydases sont, dans le monde entier, l'objet de recherches nombreuses. Des hypothèses variées ont été émises et sont encore émises, sur leur nature, le mécanisme de leur action et leur rôle.

Nous nous proposons d'exposer, dans la première partie de ce travail, quelques-unes de ces recherches et de ces hypothèses.

L'hypothèse de l'existence des ferments solubles oxydants directs précéda leur découverte d'une quarantaine d'années. Elle naquit de l'impossibilité où se trouvaient physiologistes et chimistes d'expliquer le mécanisme des oxydations énergiques dont les êtres vivants sont le siège. Des substances diverses (hydrates de carbone, matières grasses, matières albuminoïdes, etc.), y sont oxydées dans des conditions de température, de réaction et de temps où elles sont inoxydables à l'air; or, HOPPE-SEYLER (1) a établi expérimentalement que l'oxygène, abandonné par le globule rouge, ne possède pas de propriétés oxydantes plus énergiques que celles de l'oxygène atmosphérique.

Les auteurs, qui étudièrent ces oxydations organiques, les expliquèrent en admettant l'intervention d'agents spéciaux, chargés de fournir à l'organisme vivant de l'oxygène actif.

SCHÖENBEIN (2), à la suite de longues et patientes recherches, poursuivies de 1848 à 1868, sur les oxydations organiques, conclut à la présence chez les êtres vivants de corps susceptibles de fixer l'oxygène pour le transporter sur les substances oxydables.

TRAUBE (3) émit l'hypothèse de l'existence de ferments oxydants, jouant un rôle essentiel dans les oxydations organiques. Avec une prescience remarquable, il donna, du mécanisme de l'action de ces ferments hypothétiques, une explication qui, modernisée, en y introduisant la notion des ions, est admise actuellement par de nombreux auteurs.

En 1878, CLAUDE BERNARD écrivait : *Les phénomènes dont l'organisme est le théâtre sont des phénomènes chimiques soumis aux mêmes lois que ceux qui se réalisent en dehors de la vie, mais, exécutés par des agents spéciaux. Ces agents sont des ferments solubles, ils président à toutes les oxydations et hydratations de l'organisme* (4).

En 1883, HIKOROKURO YOSHIDA pressant qu'un ferment oxydant intervient dans la formation de la laque du Japon, mais il n'isola ni le ferment, ni la substance sur laquelle il agit (5).

Avec M. G. BERTRAND, la question des ferments solubles oxydants directs quitte le domaine de la pure hypothèse pour celui de l'expérimentation. C'est à cet auteur que revient le mérite d'avoir isolé la première diastase

oxydante directe, celle entrevue par Yoshida. Il lui a donné le nom de laccase (6) et, ayant constaté l'existence d'autres enzymes oxydants directs, il propose pour eux: *Le nom générique d'oxydases pour les distinguer des véritables diastases qui produisent du dédoublement avec fixation d'eau* (7).

La découverte de la laccase a suscité de nombreux travaux sur les oxydases; aussi l'histoire de ces diastases, bien que récente, est-elle déjà fort longue et son exposé intégral dépasse les limites d'un travail tel que le nôtre.

Deux faits frappent dans cette histoire: l'abondance des hypothèses formulées à propos de toutes les questions relatives aux oxydases (constitution chimique, mode d'action, rôle, etc., hypothèses que ne semblent pas toujours justifier les expériences qui les étayent), et la difficulté de l'étude de ces diastases. Cette difficulté reconnaît plusieurs causes dont les principales sont l'impossibilité d'extraire la plupart des oxydases sous la forme de « poudre ferment », c'est-à-dire sous une forme sensiblement pure; la présence très fréquente dans les tissus et les liquides organiques de substances qui masquent les réactions oxydasiques et la très grande sensibilité des oxydases à la composition du milieu.

En dépit de la multiplicité des travaux consacrés aux oxydases, les chercheurs n'en sont encore qu'à la période du dépouillement et il n'existe sur ces diastases qu'un petit nombre de documents définitifs.

PREMIÈRE PARTIE

Des ferments solubles oxydants directs ou oxydases

DÉFINITIONS

Les catalyseurs colloïdaux spécifiques retirés des organismes végétaux ou animaux et qui président à des mutations d'oxygène sont actuellement classés en :

oxydases,
peroxydiastases,
catalase.

Oxydases et peroxydiastases forment le groupe des ferments solubles oxydants. Les oxydases sont considérées comme des ferments solubles oxydants directs, les peroxydiastases comme des diastases oxydantes indirectes.

DEFINITIONS DES OXYDASES

Les oxydases ont été définies d'après leur rôle chimique et d'après leur rôle biologique.

Suivant DUCLAUX (8), les oxydases sont des diastases dont le caractère essentiel, *celui qui leur fait une place à part, est de permettre à l'oxygène atmosphérique de se porter rapidement, à la température ordinaire et dans des conditions qui restent physiologiques, sur des corps, que sans les oxydases, il n'attaquerait que plus lentement. Ce sont les agents de transport de l'oxygène.* » M. Duclaux les appelle encore des diastases de respiration.

Pour M. BACH (9): *Les oxydases transportent l'oxygène moléculaire sur les substances difficilement oxydables et agissent comme l'essence de térébenthine dans l'expérience classique de Schœnbein avec l'air et le sulfo-indigotate de soude. — Les oxydations dont l'organisme est le siège s'effectuent sous l'influence de catalyseurs spéciaux de ferments oxydants ou oxydases.*

M. DE STÖCKLIN les définit des ferments solubles qui, en activant l'oxygène de l'air, effectuent directement les oxydations (10).

Enfin, d'après M. GUILLEMINOT (11), *les oxydases sont des ferments solubles qui agissent en oxydant aux dépens de l'oxygène libre. Dans l'économie de l'organisme animal, la plupart des oxydations sont dues à des diastases.*

Pour éclairer ces définitions, je les rapprocherai de celles des peroxydiastases et de la catalase données par différents auteurs.

DEFINITIONS DES PEROXYDIASTASES

Les peroxydiastases, encore appelées peroxydases, anaéroxydases, sont des diastases dont *la propriété serait d'agir sur les peroxydes pour effectuer, par leur intermédiaire, des oxydations dont ces derniers seraient incapables à eux seuls.* DE STÖCKLIN (10).

M. BACH a défini les peroxydiastases en maintes circonstances. *Les organismes animal et végétal contiennent un ferment, la peroxydase qui produit exactement les mêmes oxydations que l'oxydase, mais seulement avec le concours du peroxyde d'hydrogène ou de peroxydes organiques* (13).

La peroxydase, en présence d'un corps oxydable, décompose l'eau oxygénée, avec mise en liberté d'oxygène actif atomique. En toute circonstance, sa fonction consiste uniquement à transporter l'oxygène faiblement combiné des peroxydes sur des substances oxydables. La peroxydase purifiée n'a pas de pouvoir oxydant propre, elle n'en acquiert pas au contact de l'air (15).

M. J. WOLFF en donne une définition identique: *Les peroxydases ne fixent pas directement l'oxygène libre ou moléculaire, mais l'empruntent aux peroxydes* (16). Nous verrons que l'opinion de M. Wolff, sur le rôle des peroxydes dans les oxydations provoquées par les peroxydiastases, s'est quelque peu modifiée, depuis 1910.

Elles appartiennent à ce groupe de diastases oxydantes desquelles DUCLAUX a écrit : *Elles sont désoxydantes pour ce corps et oxydantes pour un autre* (8).

En 1909, MM. G. BERTRAND et ROSEN BAND (17) ont

signalé quelques caractères importants des peroxydiastases:

Elles réduisent l'eau oxygénée ajoutée à leur solution, seulement en présence de certaines substances organiques qui s'emparent de l'atome d'oxygène libéré; les réactions qui servent à les déceler sont purement de laboratoire, elles ne donnent pas, comme quelques oxydases, des réactions de coloration qui sont les témoins de leur présence; les substances aromatiques qu'elles oxydent en présence d'eau oxygénée sont exactement celles oxydées par la laccase en présence d'oxygène moléculaire, ces substances donnent naissance aux mêmes dérivés dans l'un et dans l'autre processus catalytique.

De leur étude, les auteurs concluent: *C'est évidemment en raison de cette coïncidence que la peroxydiastase a été rapprochée quelquefois des oxydases. A la vérité, c'est aussi bien et même plutôt une diastase réductrice qu'une diastase oxydante. Sa constitution chimique, son mode d'action, son rôle sont inconnus.*

M. WEYL considère que les peroxydiastases se comportent comme les sels ferreux ou ferriques basiques en présence d'eau oxygénée: *elles oxydent à l'aide d'oxygène combiné et par élimination d'hydrogène à l'état d'eau* (18).

En m'appuyant sur ces définitions et sur les résultats de travaux qui ne sauraient être exposés ici, j'établirai un parallèle rapide entre les oxydases et les peroxydiastases:

1° Elles coexistent fréquemment dans les mêmes tissus et les mêmes liquides animaux et végétaux;

2° Elles sont sensibles à l'influence des mêmes agents physiques et chimiques;

3° Les peroxydiastases oxydent les corps oxydés par les oxydases, type laccase. *Pour les caractériser, on se sert des réactifs qui servent à caractériser les oxydases du type laccase, mais en y ajoutant en plus de l'eau oxygénée (16).*

4° Elles fournissent les mêmes produits d'oxydation.

D'après MM. CHODAT et BACH (19), les oxydases et les peroxydiastases présentent d'étroites relations. Une peroxydiastase proviendrait d'un système primitif oxygénase-peroxydiastase, dont l'oxygénase (peroxyde à propriétés de ferments solubles) aurait disparu en raison de son extrême fragilité; une oxydase serait un système oxygénase-peroxydiastase.

Pour la majorité des chercheurs, les deux groupes de ferments solubles oxydants ne diffèrent que par le mécanisme de leur action: ils n'utilisent pas la même forme chimique d'oxygène. Les oxydases emploient l'oxygène moléculaire, les peroxydiastases, l'oxygène naissant des peroxydes.

M. J. WOLFF (20) n'admet pas, comme une nécessité, la présence des peroxydes pour expliquer le fonctionnement des peroxydiastases.

Il a établi expérimentalement *que les peroxydiastases sont capables de jouer un rôle important comme catalyseurs sans le concours des peroxydes.*

Etant donnée la propriété que possèdent les bases alcalines de fixer l'oxygène atmosphérique sur certains phénols, l'auteur a eu l'idée d'associer l'action de l'alcali et celle de la peroxydiastase dans l'oxydation des polyphénols. Pour ses expériences, M. J. Wolff a choisi comme substratum d'oxydation l'orcine et la résorcine et

comme peroxydiastase, celle des jeunes pousses d'orge. Il a étudié l'action de la soude, de l'ammoniaque, du carbonate de sodium et du phosphate disodique en présence de la peroxydiastase. L'addition de cette diastase a eu pour effet, toutes choses égales d'ailleurs, d'augmenter notablement le volume d'oxygène fixé par les polyphénols. De ses essais, l'auteur conclut : *La peroxydiastase est capable d'accélérer d'une façon considérable les oxydations provoquées par de faibles doses d'alcalis ou de sels alcalins, sans le concours d'eau oxygénée. En se plaçant dans les meilleures conditions (au point de vue de l'action accélératrice de la peroxydiastase), on observe une absorption d'oxygène environ cinq fois plus forte en présence de ce catalyseur qu'en son absence. Le concours des peroxydes n'est nullement indispensable au fonctionnement des peroxydases et ces enzymes sont à même d'exercer une action catalytique énergique par un mécanisme différent.*

Les recherches de M. Wolff laissent donc supposer que les peroxydiastases n'ont pas qu'une seule formule de travail, comme le croyaient les premiers auteurs qui les étudièrent.

De ce parallèle entre oxydases et peroxydiastases, il ressort que ces diastases présentent de nombreux caractères communs. Ce fait explique qu'on se soit demandé si la distinction établie entre elles, au point de vue du mécanisme de leur action, ne repose pas sur une observation insuffisante, ne mettant en lumière qu'un côté de ce mécanisme. Une observation plus « fine » des réactions oxydasiques permettra peut-être de réduire à un seul les

deux groupes de diastases oxydantes primitivement établis.

DEFINITIONS DE LA CATALASE

La catalase n'est pas un ferment oxydant proprement dit. Ce n'est, en effet, ni un peroxyde du type des oxygénases, ni un ferment activant l'oxygène libre ou des combinaisons. Sa seule fonction connue est de décomposer le peroxyde d'hydrogène. CHODAT et BACH (21).

M. J. WOLFF (16) définit la catalase: *Un enzyme spécial très répandu dans les tissus animaux et végétaux et qui a la propriété de décomposer l'eau oxygénée, avec mise en liberté d'oxygène moléculaire.*

La catalase paraît accompagner toutes les diastases, aussi crut-on, jusqu'à sa découverte (22), que la propriété de décomposer l'eau oxygénée, avec mise en liberté d'oxygène moléculaire, appartenait à tous les ferments solubles.

La catalase n'est pas une diastase oxydante, elle se sépare donc nettement des oxydases et des peroxydiastases.

RÉACTIFS GÉNÉRAUX DES FERMENTS SOLUBLES OXYDANTS DIRECTS

Les corps, utilisés comme réactifs généraux des ferments solubles oxydants directs, ont un caractère chimique commun, ils possèdent tous de l'hydrogène mobile, facilement oxydable. Cet hydrogène peut être aminé, phénolique ou alcoolique.

L'étude détaillée des réactifs généraux des oxydases a été faite par différents auteurs : P. Sée (23), P. Portier (24), Enriquez et Sicard (25), Hunger (26), aussi me bornerai-je à rapporter les points essentiels de l'histoire de ces composés.

Ils ont été divisés en deux groupes, le premier comprend ceux dont l'oxydation s'accompagne de phénomènes immédiatement visibles (apparition d'un précipité ou d'une coloration), le deuxième renferme les réactifs dont l'oxydation ne peut être décelée que par une analyse chimique.

Réactifs du premier groupe

Ils sont nombreux et surtout employés pour la recherche des oxydases végétales.

Les plus fréquemment utilisés sont la teinture récente

de résine de gayac, l'émulsion de résine de gayac, les solutions aqueuses de gayacol, d'hydroquinone, de pyrogallol, le réactif Röhmann et Spitzer.

Teinture récente de résine de gayac.

Les oxydases la colorent en bleu. Cette coloration est due à l'oxydation de l'acide gayaconique, un des constituants de la résine.

On la prépare avec de la résine non oxydée et avec de l'alcool éthylique exempt d'eau oxygénée. MM. G. Bertrand et Thomas indiquent de dissoudre à chaud 5 gr. de résine de gayac dans 60 à 70 cm³ d'alcool à 96°, de filtrer et d'ajouter 30 cm³ d'eau environ (14).

L'emploi de ce réactif ne comporte aucune technique spéciale, on en met, à la température ordinaire, quelques gouttes au contact du corps en expérience.

On ne doit se servir que de teinture très récente, gardée à l'abri de l'air et de la lumière. Au contact de ces deux agents, le réactif se charge très rapidement d'eau oxygénée. Or, en présence de ce composé les peroxydiastases donnent aussi une coloration bleue avec la teinture de résine de gayac.

Cette formation rapide et constante d'eau oxygénée dans la teinture de résine de gayac fut longtemps ignorée. Elle a valu à de nombreuses peroxydiastases le titre temporaire d'oxydases. Ce fait explique pourquoi des oxydases de la première heure ont pris rang, dans la suite, parmi les peroxydiastases.

La formation de peroxyde d'hydrogène dans la teinture de résine de gayac est si rapide que, suivant cer-

tains auteurs, il est prudent de n'utiliser que de la teinture préalablement chauffée pendant plusieurs heures à $+ 50$, $+ 60^{\circ}$, ou filtrée, après agitation prolongée avec du noir animal. Ces deux traitements ont pour effet de débarrasser le réactif du peroxyde qu'il peut contenir.

Si la teinture de résine de gayac chargée d'eau oxygénée est impropre à la recherche des oxydases, la teinture pure est-elle un réactif spécifique de ces diastases ? Non, puisque différents composés, non diastasiques, peuvent la colorer en bleu.

M. DUPOUY (27) a fait une étude systématique de ces agents.

M. PIGHINI (28) signale que la teinture récente est colorée en bleu par des solutions très étendues de sels de cuivre, de fer, de manganèse, en l'absence d'acides forts.

M. SARTORY (29) obtient une coloration bleue en ajoutant à la teinture récente des solutions de sels minéraux chimiquement purs, préparées avec de l'eau distillée dans des appareils en verre.

M. FOUARD (30) a observé que les chlorures alcalins et alcalino-terreux colorent en bleu cette même teinture de gayac.

M. DONY-HÉNAULT (31) a établi l'influence de l'ion OH dans l'oxydation spontanée de la résine de gayac. Ses expériences lui ont montré que la sensibilité de la résine à l'alcali *atteint celle des indicateurs et la dépasse même s'il s'agit d'indicateurs tel que la phtaléine du phénol ou le tournesol.*

Quelques-uns des corps signalés par MM. Dupouy, Pughini, Fouard, Dony-Hénault, comme actifs sur la

résine de gayac peuvent accompagner les oxydases dans les tissus et les liquides organiques.

La coloration bleue donnée par la teinture de gayac ne permet donc de conclure à la présence d'une oxydase que si on s'est assuré de l'absence des peroxydes et de celle des agents d'oxydation, non diastatiques, susceptibles d'agir sur le réactif.

Récemment, M^{me} ONSLOW (153) a exposé le mécanisme du bleuissement de la résine de gayac sous l'influence des oxydases. De ses expériences, l'auteur conclut que trois facteurs sont nécessaires pour le bleuissement du gayac : une substance aromatique avec deux oxhydryles en position ortho, une oxygénase qui catalyse l'oxydation de cette substance avec production d'un peroxyde organique ou de peroxyde d'hydrogène par décomposition du peroxyde organique, et une peroxydase qui transporte l'oxygène actif des peroxydes sur des composés facilement oxydables comme la résine de gayac. L'oxygénase et le composé aromatique peuvent être remplacés par le peroxyde d'hydrogène ou par un peroxyde provenant de l'autoxydation d'une substance organique. M^{me} Onslow estime que si l'oxydase (synonyme de laccase, phénoloxydase, phénolase) est définie comme une diastase bleuisant le gayac, ces trois composants sont essentiels à sa composition, car le mélange des enzymes seuls, oxygénase et peroxydase, est incapable de produire le bleuissement du gayac.

Des recherches de M^{me} Onslow, il ressort que le bleuissement de la teinture de gayac est, tout à la fois, le témoin de la présence d'une oxydase et celui d'un composé aromatique de constitution chimique spéciale.

Emulsion de résine de gayac.

Les oxydases la colorent en bleu. Elle est obtenue, le plus souvent, en mélangeant un volume de teinture de résine avec quatre ou cinq volumes d'eau distillée.

Solution aqueuse de gayacol.

L'addition d'une oxydase à ce réactif détermine l'apparition d'une coloration rose pâle, qui vire au rouge grenadine, puis au rouge pourpre et enfin celle d'un précipité rouge pourpre de tétragayacoquinone.

On emploie la solution aqueuse saturée ou la solution à 1 %.

M. J. Wolff (32) a constaté que *l'oxydation du tanin, sous l'influence de la laccase, empêche ou masque complètement la réaction du gayacol*. En outre, il a obtenu une formation lente de tétragayacoquinone en soumettant le gayacol à l'action d'un nitrite en présence de phosphates ou de citrates acides.

Tanin, phosphates acides et nitrites (33) peuvent exister dans certains végétaux, les faits signalés par M. J. Wolff sont donc importants à connaître pour permettre une interprétation judicieuse de la réaction fournie par le gayacol, en solution aqueuse, avec des sucs ou des tissus végétaux.

M. Dony-Hénault a obtenu la coloration et le précipité que les oxydases, type laccase, fournissent avec le gayacol, en traitant ce phénol par un mélange en proportions convenables d'alcali et de perchlorure de fer (31).

Les résultats expérimentaux obtenus par MM. J. Wolff

et Dony-Hénault prouvent que la réaction fournie par le gayacol doit toujours être interprétée avec soin.

Solution aqueuse d'hydroquinone à un pour cent.

L'addition d'oxydase à ce réactif détermine la formation de quinone, caractérisée par sa coloration jaune et par son odeur. Si l'oxydation est moins énergique, il y a apparition de lamelles vertes de quinhydrone provenant de la combinaison de la quinone avec l'excès d'hydroquinone.

Solution aqueuse de pyrogallol à un pour soixante.

Avec les oxydases, il y a production d'un précipité auquel M. Amé Girard a donné le nom de purpurogalline. Ce précipité est soluble en rouge dans l'acide sulfurique, en bleu dans l'ammoniaque.

Réactif de Röhmman et Spitzer.

On prépare une solution mère avec :

Paraphénylènediamine.....	}	1 gr. à 1 gr. 50
Naphtol α		
Soude caustique,.....		
Eau distillée		100 gr.

Pour les recherches d'oxydases, on utilise la solution suivante :

Solution mère	1 gr.
Eau distillée	50 ou 100 gr.

qui se colore en bleu en présence d'une oxydase.

Tous les réactifs de ce groupe s'altèrent rapidement, aussi, leur préparation doit-elle être extemporanée.

Ces réactifs ne peuvent être employés pour rechercher la tyrosinase, elle ne donne ni coloration bleue avec la teinture de gayac, ni coloration rouge avec le soluté aqueux de gayacol, et elle ne fournit ni quinone, ni purpurogalline avec l'hydroquinone et le pyrogallol. Ainsi que nous le verrons, elle possède des réactifs spéciaux sur lesquels les oxydases, type laccase, sont sans action.

Recherche exacte des oxydases.

MM. G. BERTRAND et THOMAS (14) ont donné un procédé de recherche exacte des oxydases basé sur le caractère fondamental de ces diastases *qui est de fixer l'oxygène de l'air sur les corps-oxydables.*

Cette recherche nécessite l'emploi d'un appareil spécial formé de deux tubes de verre, communiquant entre eux; dans l'un on introduit quelques gouttes de la solution, étudiée, dans l'autre quatre ou cinq centimètres cubes de la solution d'un corps oxydable. On fixe sur cet appareil, par l'intermédiaire d'un anneau de cire Golaz, un capuchon de verre muni d'un tube effilé. Par l'intermédiaire de ce tube, on fait le vide dans l'appareil, on lave le contenu des tubes à l'anhydride carbonique et on fait de nouveau le vide. On répète cette manœuvre deux ou trois fois afin de purger complètement l'appareil de l'oxygène qu'il renferme. Enfin, on fait le vide, et on scelle l'appareil à la lampe.

Si on le renverse de manière à mélanger le contenu des deux tubes, il n'y a production d'aucune coloration,

même après plusieurs jours. Si on laisse rentrer l'air, le liquide se colore peu à peu dans le cas de la présence d'une oxydase.

Réactifs du deuxième groupe

Avec ces réactifs, la présence d'une oxydase est déduite, soit de l'absorption de l'oxygène par le système réactif-oxydase, soit de la production d'un composé d'oxydation dont l'existence est décelée par l'analyse chimique. Ces réactifs sont surtout utilisés pour la recherche des oxydases animales et pour leur identification.

A côté de ces deux groupes de réactifs employés pour déceler les ferments solubles oxydants directs dans les tissus et les sucs animaux et végétaux, se placent les réactifs utilisés pour déterminer leur localisation dans les cellules. Ceux dont on se sert le plus fréquemment sont la solution aqueuse saccharosée de pyrogallol pour les oxydases végétales et le réactif Röhmann et Spitzer pour les oxydases animales.

Solution de pyrogallol saccharosée.

Au contact du réactif, les éléments cellulaires contenant des oxydases se colorent en jaune, puis en rouge orangé et finalement, on voit apparaître à leur intérieur des cristaux de purpurogalliné.

M. Chodat, auquel on doit la formule de ce réactif, a constaté qu'il offre l'avantage de déceler et la laccase et la tyrosinase.

Suivant les indications de M. Chodat, on prépare cette solution en dissolvant un gramme de pyrogallol chimiquement pur dans une solution aqueuse à 1 % de saccharose ou dans une solution qui soit osmotiquement supportable par des cellules, *dans ces conditions, le pyrogallol ne tue ni le protoplasma, ni le noyau.*

M. Chodat signale que dans l'emploi du réactif ainsi préparé, il faut éviter l'altération des cellules et le noircissement du noyau qui sont une indication de désorganisation.

Réactif de Röhmann et Spitzer.

D'après M. Marinesco (34), ce réactif donnerait d'excellents résultats quand on l'emploie suivant la technique signalée récemment par S. Gräff et Ev. Gierke.

Les liqueurs nécessaires sont :

1° Une solution à 1 pour 1.500 ou 1 pour 2.000 de naphtol α dans du sérum physiologique;

2° Une solution à 1 pour 1.500 ou 1 pour 2.000 de diméthylparaphénylènediamine dans du sérum physiologique;

3° Un mélange de 10 volumes de Gram, dans 30 volumes de sérum physiologique ;

4° Une solution aqueuse d'acide osmotique à 1 pour 100.

5° Une solution aqueuse saturée de carbonate de lithine;

6° Une solution de carmin aluné;

7° Du sérum physiologique.

L'activité des liqueurs 1 et 2 diminue assez rapidement, en général, elles sont inutilisables au bout de trois semaines. Il est préférable d'employer des solutions récentes. La solution de naphtol α doit être préparée la veille du jour où on l'utilise.

La technique de la recherche est la suivante : Au moment de l'emploi on chauffe la solution de naphtol α au bain-marie, on la filtre et l'on ajoute au filtrat un égal volume de solution de diméthylparaphénylènediamine. Les coupes, ayant en moyenne 15 τ et obtenues à l'aide du microtome, après congélation par l'anhydride carbonique, sont plongées dans le mélange.

Après quelques minutes d'immersion la coupe entière est colorée en violet, puis en bleu foncé. Quand la coloration est stable, on lave les coupes dans du sérum physiologique. On les plonge ensuite dans le mélange liquide de Gram-sérum physiologique, où on les laisse de 4 à 10'. On peut ajouter à ce liquide 2 cm³ de solution d'acide osmique à 1 pour 100.

Les coupes sont alors placées dans 40 cm³ de sérum physiologique, auquel on ajoute 2 à 3 grammes de solution saturée de carbonate de lithine.

Les coupes, qui étaient devenues brunes dans le réactif iodo-ioduré, reprennent leur couleur primitive dans le réactif sérum physiologique, carbonate de lithine, après quelques minutes d'immersion. On peut, sans inconvénient, les laisser plusieurs heures dans ce réactif.

Les oxydases soumises à ce traitement apparaissent colorées en bleu dans les cellules par formation de bleu d'indophénol.

EXTRACTION DES FERMENTS SOLUBLES OXYDANTS DIRECTS

Les procédés d'extraction les plus employés sont la précipitation alcoolique et l'entraînement par dissolution dans l'eau ou dans la glycérine.

Ces deux procédés fournissent des produits de valeurs différentes pour l'étude de la diastase isolée. La précipitation alcoolique donne une « poudre-ferment » constituée par la diastase accompagnée par une petite quantité d'impuretés. L'étude de la diastase isolée sous cette forme peut être faite avec quelque précision et elle constitue un document précieux pour la connaissance générale des ferments solubles.

Malheureusement, tandis que de nombreuses diastases hydratantes (pepsine, papaïne, émulsine, invertine, etc.) sont obtenues à l'état de « poudre-ferment », quelques oxydases seulement (laccase, tyrosinase, alcooloxydase) sont isolées sous cette forme.

Quelques-unes de ces diastases sont extraites sous forme de solutions aqueuses ou glycélinées. Ces solutions ne permettent pas une étude précise de l'oxydase qu'elles renferment. Elle y est accompagnée par les consti-

tuants de l'organe ou du liquide dont on l'a extraite, solubles dans le liquide d'épuisement. De plus, la nature et la proportion de ces constituants varient avec de nombreux facteurs : substances employées comme source d'oxydase, solvant, procédé d'extraction, conditions opératoires de l'extraction, etc. Ainsi, M. J. Wolff a constaté que la teneur en sels des macérations glycéринées de *Russula delica* croît avec la durée du contact du champignon avec le solvant.

Ces substances n'assistent pas indifférentes à la réaction oxydasique, elles y participent et peuvent la modifier dans un sens insoupçonné; dans quelques cas, elles déterminent des réactions secondaires, indépendantes de l'oxydase et qui masquent la réaction diastasique. Dans son étude de l'influence de l'acide borique sur l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase, M. Agulhon (158) a dû abandonner le soluté aqueux de son froment comme liqueur oxydasique, ce soluté, très riche en sels de chaux, détermine une précipitation des produits d'oxydation à l'état de mélanines, masquant la réaction oxydasique.

Beaucoup d'oxydases n'ont pas été isolées, elles ont été étudiées « in situ » dans les tissus et les liquides où leur présence avait été signalée soit par les colorations qu'elles fournissent avec des substances qui les accompagnent, soit par les réactifs généraux de ce groupe de diastases.

CONSTITUTION CHIMIQUE DES FERMENTS SOLUBLES OXYDANTS DIRECTS

Des recherches nombreuses ont été entreprises pour établir la constitution chimique des ferments solubles oxydants directs. Les résultats obtenus ont servi de base à deux théories : D'après la première, *les oxydases sont des composés organiques métalliques*, et d'après la deuxième, *ces oxydases sont des composés organiques exempts d'éléments métalliques*.

Je ferai un exposé sommaire de quelques-unes de ces recherches et j'y joindrai les critiques qu'elles ont suscitées.

Première théorie

Des travaux d'analyse et de synthèse ont servi à l'édifier.

Travaux de M. G. BERTRAND.

Ce sont les premiers chronologiquement. Ils ont eu pour objet l'oxydase de l'arbre à laque, la laccase, et quelques oxydases végétales du type laccase.

M. G. Bertrand (35) a établi la présence constante du manganèse dans ces diastases, l'existence d'une relation entre leur pouvoir oxydant et leur teneur en métal et il a signalé l'analogie des propriétés oxydantes des sels de manganèse et des oxydases type laccase.

De ses recherches, l'auteur conclut que la laccase et les oxydases du même type, doivent être envisagées comme des combinaisons instables du manganèse avec un corps organique comparable à un acide faible.

Tous les auteurs ne partagent pas l'opinion de M. G. Bertrand sur la relation qui existe entre le manganèse et la partie organique des oxydases type laccase. Il y a combinaison chimique dit M. G. Bertrand, il y a adsorption, objecte M. Achalme : *L'étude récente des composés d'adsorption permet de supposer que c'est sous cette forme que l'ion manganèse est fixé au granule colloïdal et lui communique des propriétés oxydantes particulières* (36).

Travaux de M. SARTHOU (37).

M. Sarthou a constaté la présence du fer dans la schinoxydase, oxydase qu'il a retirée du *Schinus molle* (térébinthacées).

M. Sarthou a établi l'existence d'une relation entre la valeur du pouvoir oxydant de la schinoxydase et sa teneur en fer. A son avis, le fer existe dans cette oxydase à l'état de composé organique et il y joue le rôle du manganèse dans la laccase (38).

Les travaux de MM. G. Bertrand et Sarthou ont révélé une analogie de constitution entre la laccase et la schino-

xydase, toutes deux sont formées d'un élément métallique, uni à un composé organique. Ces deux auteurs ne partagent pas le même avis sur le rôle joué par chacun des constituants. Pour M. G. Bertrand, c'est l'élément métallique qui est la complémentaire active, pour M. Sarthou *le pouvoir oxydant des oxydases dépend bien plus de la constitution de leur partie organique que de la quantité de métal qu'elles contiennent.*

Travaux de M. CANTACUZENE (39).

L'auteur a observé dans le *Phallusia mamillata*, la présence de fortes proportions de vanadium et celle d'une oxydase particulièrement énergique.

Il suppose que le vanadium joue dans cette oxydase le rôle du manganèse dans la laccase et celui du fer dans la schinoxydase.

OBJECTIONS PRÉSENTÉES PAR DIFFÉRENTS AUTEURS

Quelques auteurs opposent à ces résultats ceux qu'ils ont obtenus dans leurs propres recherches.

MM. CHODAT et BACH ont isolé des peroxydiastases très énergiques, dépourvues de manganèse et de fer. Les peroxydiastases doivent, suivant ces auteurs, contenir les constituants essentiels des oxydases, puisqu'elles effectuent, en présence d'eau oxygénée, toutes les oxydations réalisées par les oxydases.

M. ROSENFELD (40) a également isolé une peroxydiastase exempte de fer.

M. CHODAT a préparé une oxydase très active dépourvue de manganèse.

M. DE STOECKLIN a obtenu une peroxydiastase sans manganèse. De ses travaux personnels et de ceux de M. Chodat, il conclut : *Ni l'oxydase purifiée du Lactarius, étudiée par M. Chodat, ni notre peroxydase purifiée ne contiennent de manganèse. Il faut donc penser que, si dans quelques oxydations, le manganèse joue le rôle qui lui est attribué par G. Bertrand, il n'est cependant pas nécessaire* (41).

M. VAN DER HAAR (126) a obtenu des cultures d'*Hedera helix* à teneur normale en oxydases et exemptes de manganèse. Il en conclut que la théorie suivant laquelle les oxydases doivent être considérées comme des complexes mangano-protéïques n'est pas « valable ».

Devant l'insuffisance des résultats fournis par l'analyse des oxydases, quelques chercheurs tentèrent de déterminer la constitution chimique de ces diastases par la synthèse. Ils préparèrent des systèmes chimiques possédant les propriétés oxydantes des oxydases. Ils firent ce qu'on a désigné sous les noms d'*oxydases artificielles*, d'*oxydases de synthèse*.

Travaux de M. TRILLAT (42).

M. Trillat a obtenu une solution colloïdale de manganèse, en incorporant des traces de chlorure manganoux à une solution aqueuse faiblement alcaline d'ovalbumine à 3 pour 100.

Cette solution partage avec les oxydases, type laccase,

le pouvoir de fixer l'oxygène de l'air sur le pyrogallol, avec formation d'abondants cristaux de purpurogalline.

Travaux de M. J. WOLFF (16).

M. J. Wolff a réalisé, en présence d'eau oxygénée, à l'aide d'une solution de ferrocyanure de fer colloïdal, des oxydations identiques à celles obtenues avec les oxydases type laccase. Les produits d'oxydation sont les mêmes, et l'on constate la même disproportion entre la masse du produit oxydé et celle de l'oxydant.

De travaux faits en collaboration, MM. J. Wolff et de Stœcklin concluent : *L'élément actif des enzymes oxydants artificiels et probablement aussi des naturels, est le fer, à l'état de combinaison organique. Il résulte de la communauté d'action du ferrocyanure de fer colloïdal et des enzymes oxydants du type laccase que nous sommes fondés à considérer ces diastases, non pas comme des substances albuminoïdes à fonction physiologique spéciale, mais comme des composés chimiques ou des associations de combinaisons chimiques définies, relativement simples, à fonctions catalytiques spécifiques et précises, dans lesquelles l'élément minéral semble jouer un rôle prépondérant* (43).

Travaux de M. A. JOB.

M. Job (44) a oxydé le glucose avec les carbonates de cérium, en milieu alcalin. Cette oxydation présente les caractères des réactions catalytiques, il y a, notamment, disproportion entre la masse du corps oxydé et celle de l'oxydant, aussi l'auteur a-t-il pu écrire : *L'oxydation du*

glucose provoquée par un sel de cérium... est actuellement l'exemple le plus net et le mieux connu de catalyse oxydante.

Il a observé que le glucose, réducteur du sel cérique, peut, associé avec ce sel, provoquer une oxydation illimitée de l'arsenic.

Il a constaté que de nombreux sels sont susceptibles de déterminer l'oxydation catalytique de l'hydroquinone : acétates de cérium, de lanthane, de néodyme, de praséodyme, d'yttrium, de nickel, et de cobalt (45).

Travaux de M. DONY-HERAULT (46).

M. Dony-Hénault a préparé une « laccase de synthèse » en précipitant par l'alcool — *image de la préparation de la laccase naturelle*, dit l'auteur — une solution aqueuse de gomme arabique, préalablement additionnée d'une petite quantité d'ovalbumine dialysée, de sel de manganèse, d'alcali (libre ou à l'état de sel faiblement alcalinisé, sel de Seignette).

Le produit obtenu dans ces conditions a la labilité de la laccase vis-à-vis de la chaleur et son pouvoir oxydant à l'endroit de la teinture de gayac, du pyrogallol et de l'hydroquinone.

Travaux de MM. J. WOLFF et de STÖCKLIN.

MM. J. Wolff et de Stöcklin ont réalisé un système chimique : tannate de fer peroxyde d'hydrogène qui oxyde la tyrosine.

Nous terminerons cette étude en signalant une sugges-

tion formulée par M. Fouard (47) sur la constitution chimique des oxydases. M. Cossa (48) a établi par des analyses chimiques et spectrales que les métaux des terres rares sont très répandus dans la nature à un état d'extrême dilution et qu'ils entrent dans la composition des êtres organisés.

M. Fouard a constaté que les composés halogénés des terres rares jouent un rôle catalytique dans la fixation de l'oxygène libre par les solutions aqueuses de polyphénols. En présence de ces résultats expérimentaux et de ceux obtenus par M. Cossa, M. Fouard conclut : *Sans vouloir exprimer ici l'hypothèse que ces éléments entrent dans la structure minérale de certaines diastases oxydantes, il me semble permis de rapprocher les faits établis dans ce travail, de ceux mis en évidence par les recherches de Cossa.*

Les travaux que nous venons d'étudier laissent supposer que des métaux divers sont susceptibles de constituer la partie minérale des oxydases.

Il semble difficile, en effet, d'admettre une formule unique de constitution des ferments solubles oxydants directs. Cette opinion, MM. J. Wolff et de Stœcklin l'expriment en termes particulièrement heureux : *Nous n'entendons désigner sous ces vocables (diastase et enzyme) nulle entité physiologique ou chimique, mais uniquement des fonctions catalytiques spéciales que nous ne considérons pas comme forcément liées, pour une fonction déterminée, à une combinaison chimique unique. Nous pensons, au contraire, que s'il était prouvé qu'une fonction oxydasique donnée pût n'être dévolue qu'à un seul élément, au fer par exemple, elle doit, en tout cas,*

revêtir autant de formes diverses que doivent lui en imposer les conditions de milieu où se passent ces réactions.

De cette rapide revue des travaux qui ont servi à édifier la théorie de la constitution minérale des oxydases, il ressort que quelques faits sont acquis d'une façon incontestable :

1° Présence constante du manganèse dans la laccase et dans des oxydases du type laccase;

2° présence du fer dans la schinoxydase;

3° possibilité de produire, à l'aide de systèmes chimiques de composition nettement définie et contenant un élément minéral approprié, des oxydations identiques à celles dues aux oxydases naturelles.

DEUXIÈME THÉORIE

Pour les partisans de cette théorie, les oxydases sont des substances organiques exemptes d'élément minéral.

M. SPITZER (49) attribue aux ferments solubles oxydants directs la nature de nucléo-protéïdes.

M. EFFRONT (50) estime que certaines oxydases sont dépourvues d'azote et se rapprochent des gommes.

MM. CHODAT et BACH (21) expriment une opinion analogue : *La nature chimique des oxydases est encore parfaitement inconnue. Les meilleures préparations obtenues dans nos extractions ne donnent que des réactions à peine sensibles quant à la présence des matières albuminoïdes. Par contre, elles contiennent des substances gommeuses. Il est donc douteux que les oxydases soient des albuminoïdes.*

Mme WOKER considère les oxydases comme des composés de nature aldéhydrique (51).

Des recherches effectuées sur des oxydations catalytiques chimiques ont montré que de telles oxydations peuvent être effectuées par des corps dans la constitution chimique desquels n'entre aucun élément métallique.

M. MARCELLIN BERTHELOT a établi que l'essence de térébenthine non seulement absorbe l'oxygène de l'air, mais peut encore jouer le rôle de catalyseur dans l'oxydation de composés relativement stables à l'air (indigo, acide pyrogallique, etc.).

MM. J. BOUGAULT et P. ROBIN (52) ont constaté que ces corps non saturés, de fonctions et de composition variées, sont susceptibles d'oxyder régulièrement certains composés. Par l'intermédiaire d'huiles non saturées (olive, coton, lin, ricin, œillette, foie de morue), ils ont oxydé l'ypérite S $(\text{CH}^2 \text{CH}^2 \text{Cl})^2$ et ont obtenu le sulfoxyde SO $(\text{CH}^2 \text{CH}^2 \text{Cl})^2$. Ils ont observé que l'essence de térébenthine réalise la même oxydation, ainsi que des corps qui sont des carbures non saturés ou qui en renferment : essence de citron, géraniolène, cyclogéraniolène, menthène. En se servant de citral, ils ont pu oxyder régulièrement le thiodiglycol S $(\text{CH}^2 \text{CH}^2 \text{OH})^2$ et obtenir le sulfoxyde correspondant SO $(\text{CH}^2 \text{CH}^2 \text{OH})^2$.

De leurs recherches, MM. Bougault et Robin ont dégagé deux notions importantes : c'est à la qualité de corps non saturé qu'est attaché le rôle d'oxydant; pour réussir dans ces expériences et obtenir à l'état isolé et pur le produit d'oxydation cherché, il paraît utile, sinon indispensable, que le liquide catalyseur remplisse deux condi-

tions, d'une part, qu'il dissolve le corps à oxyder et d'autre part, qu'il ne dissolve pas ou très peu le corps oxydé.

Les résultats des travaux de MM. Berthelot, Bougault et Robin constituent donc de puissants arguments en faveur de la deuxième théorie de la constitution chimique des oxydases.

Les recherches sur la constitution chimique des oxydases ont fourni des résultats quelque peu divergents, mais on ne peut assurer que les analyses aient porté sur des oxydases pures et une opinion formulée par MM. Chodat et Bach semble traduire la réalité des faits : *La nature du substratum auxquels sont liés les ferments oxydants dépend, en majeure partie des matériaux extraits et du procédé de préparation. Il y a ici comme un phénomène de teinture par lequel des colloïdes de nature diverse retiennent, en vertu de forces moléculaires d'adhésion, un autre colloïde en fausse solution, le ferment.*

Cet exposé terminé, il nous faut, avec M. Bach, reconnaître notre ignorance presque complète de la constitution chimique des oxydases. *Non seulement leur structure et leur configuration, mais encore leur constitution chimique, nous sont totalement inconnues, aucun ferment n'ayant été préparé jusqu'ici à l'état pur* (53).

Tout porte à croire que cette constitution, comme celle des vitamines et des diastases en général, échappera longtemps encore à notre investigation.

MÉCANISME DE L'ACTION DES FERMENTS SOLUBLES OXYDANTS DIRECTS

Le mécanisme de l'action des oxydases est imparfaitement connu. Diverses théories ont été émises pour l'expliquer.

Théorie de M. G. BERTRAND.

Elle repose sur la théorie de l'activation de l'oxygène moléculaire de Hoppe-Seyler. Théorie qui peut être ainsi résumée : un corps réducteur dédouble la molécule d'oxygène, fixe l'un des atomes, l'autre se portant sur un corps oxydable.

M. G. Bertrand considère la laccase comme une combinaison peu stable de manganèse et d'un composé organique jouant le rôle d'acide faible. Sa formule serait : MnR .

D'après l'auteur, les réactions suivantes s'accompliraient dans l'action de la laccase : au contact de l'eau, le sel de manganèse s'hydrolyse et il y a formation de protoxyde de manganèse, corps très réducteur :



en présence d'oxygène moléculaire, le protoxyde de man-

ganèse se transforme en bioxyde, avec mise en liberté d'oxygène atomique qui peut agir sur un corps oxydable :



le bioxyde de manganèse, au contact de l'acide RH° donne le sel primitif, avec production d'eau et libération d'un nouvel atome d'oxygène :



et les mêmes réactions se reproduisent dans le même ordre.

Ce ne sont pas là simples vues de l'esprit, M. G. Bertrand a constaté que le protoxyde de manganèse en suspension dans l'eau s'oxyde en donnant du bioxyde,

que le bioxyde, en solution aqueuse acide, se transforme en sel de protoxyde de manganèse.

M. Bach (54) objecte à cette théorie, que le manganèse ne saurait être, pas plus que le fer, l'agent essentiel de l'activation diastasique de l'oxygène puisque : *L'oxydase des champignons peut être complètement débarrassée du fer et du manganèse sans perdre son activité.* Il rappelle, en outre, que des substances purement organiques peuvent permettre des oxydations, par exemple, l'essence de térébenthine, dans l'expérience classique de Schœnbein.

Les travaux de MM. J. Bougault et P. Robin, précédemment rapportés, prouvent aussi que des oxydations catalytiques peuvent être effectuées par des corps organiques exempts d'élément métallique.

Théorie des oxydases-peroxydes.

M. Bach applique, aux oxydations diastases, sa théorie de l'activation de l'oxygène moléculaire dans les

phénomènes d'oxydation lente (55). Dans ces phénomènes, l'activation de l'oxygène serait due à la formation intermédiaire d'un peroxyde $A \begin{smallmatrix} O \\ < \\ O \end{smallmatrix}$, dans lequel les deux atomes d'oxygène moins solidement unis entre eux que dans la molécule d'oxygène: $O = O$, sont plus mobiles.

L'auteur considère que: *l'activité de l'oxydase est due à la formation de peroxydes* et que les oxydases sont des peroxydes à propriétés de diastases.

MM. Chodat et Bach ont étayé la théorie des oxydases-peroxydes sur l'ensemble des faits suivants :

- 1° des oxydases végétales fournissent la réaction des peroxydes avec le réactif iodo-ur-amidonné, acidulé;
- 2° dans les végétaux, les oxydases et les peroxydases présentent la même localisation;
- 3° les corps organiques, qui fonctionnent comme oxydases, donnent des peroxydes isolables (essence de térébenthine, aldéhyde benzoïque) ;
- 4° Certains sels métalliques activent tout à la fois le peroxyde d'hydrogène et les oxydases.

Nous rapporterons sommairement les expériences qui ont permis à MM. Chodat et Bach d'établir les faits 1 et 2.

Ils ont obtenu une coloration bleue, en traitant les tissus de certains végétaux par l'iodure de potassium amidonné acidulé ; sachant que cette coloration bleue peut être fournie, dans les mêmes conditions expérimentales, par les peroxydes, le chlore, ou les nitrites, ils ont constaté l'absence d'eau oxygénée, de chlore et de nitrites dans les tissus en expérience. Ils en ont conclu que la réaction ne pouvait être imputable qu'à des peroxydes autre que le peroxyde d'hydrogène, et que ces composés

ne pouvaient être que des oxydases. Ils ont, en outre, établi chez un grand nombre de plantes le parallélisme absolu entre la réaction au gayac et celle à l'iodure de potassium.

Trois séries d'expériences permirent aux auteurs de constater qu'oxydases et peroxydes ont même localisation. Celle des deux premières séries ont établi que peroxydes et oxydases sont dans les cellules et celles de la troisième ont montré que les cellules qui contiennent les peroxydes sont dans les mêmes régions que les cellules à oxydases.

Voici ces expériences :

a) Si, par diffusion et plasmolyse ménagées, on fait pénétrer de l'iodure de potassium dans le plasma de cellules vivantes, on constate que l'oxydation de l'acide iodhydrique se fait à l'intérieur de la cellule.

C'est donc là que se trouvent les peroxydes.

b) C'est également dans la cellule que le pyrogallol se transforme en purpurogalline. Les oxydases sont donc aussi logées dans la cellule. Les cristaux de purpurogalline se déposant dans les amyloleucites, MM. Chodat et Bach en concluent que *les amyloleucites sont le siège des ferments oxydants*.

c) En touchant des sections fraîches végétales avec des bandes de papier imprégnées d'émulsion de gayac, de réactif ioduré-amidonné, de métaphénylènediamine, les auteurs constatèrent que *les régions périphériques qui donnent au papier gayac un cercle bleu, donnent un cercle violet avec le papier ioduré et un cercle d'un bleu magnifique avec le papier au métaphénylènediamine*. Les trois cercles sont superposables, ce qui, d'après MM. Cho-

dat et Bach, parle en faveur d'une même localisation d'un même principe oxydant.

L'argumentation de MM. Bach et Chodat n'a pas entraîné toutes les convictions. Plusieurs objections ont été faites à leur théorie.

Objection de LÖEW et PFEFFER.

Pour MM. Löw et Pfeffer, la théorie de l'existence normale des peroxydes dans les végétaux ne saurait être soutenue, en raison de la toxicité des peroxydes pour les êtres vivants. Ils objectent, en outre, que la présence normale de ces composés n'a jamais été constatée dans un organisme vivant.

MM. Chodat et Bach opposent à ces affirmations des résultats expérimentaux. Ils ont cultivé, avec succès, le *Penicillium glaucum* et le *Sterigmatocystis nigra* dans un liquide nutritif contenant de l'eau oxygénée dont la proportion était maintenue constante au moyen d'un dispositif spécial. Cette expérience prouve donc que la toxicité du peroxyde d'hydrogène est moins grande qu'on ne le croit communément. Ils rappellent qu'ils ont constaté la présence des peroxydes dans les végétaux à l'aide du papier ioduré amidonné et par plasmolyse d'une solution d'iodure de potassium. Toutefois, ils reconnaissent que la quantité de peroxydes contenue dans les végétaux est toujours très faible, ces corps étant détruits au fur et à mesure de leur formation (21) (56).

M. Aso (57) se refuse à attribuer les réactions de la teinture de gayac et de l'iodure de potassium amidonné à un même facteur.

Il trouve une preuve de son affirmation dans ce fait qu'un suc ou un organe qui donne les deux réactions ne fournit plus que celle du gayac après un certain temps.

MM. Chodat et Bach expliquent ce changement par la production probable dans le suc ou dans l'organe d'une substance, active seulement sur l'iodure de potassium et par l'atténuation possible de l'oxydase qui ne peut plus être décelée que par le réactif le plus sensible, c'est-à-dire par le gayac.

M. Aso estime que ce sont les nitrites qui déplacent l'iode dans les végétaux.

En présence de cette objection, MM. Chodat et Bach recherchèrent les nitrites dans des sucres végétaux à l'aide du réactif si sensible de Griess. Ils obtinrent des résultats négatifs, et conclurent que la présence des peroxydés dans les végétaux ne sauraient être mise en doute.

MM. LAURENT (58) et MAZÉ (33) ont mis en évidence la présence constante des nitrites dans la sève des végétaux supérieurs. Les nitrites, donnant une coloration bleue avec le réactif iodo-amidoné acidulé, les découvertes de MM. Mazé et Laurent restreignent la portée de la théorie des oxydases-peroxydes basée surtout sur la coloration bleue que les sucres et les tissus végétaux fournissent avec ce réactif.

Objection de M. WOLFF.

M. J. Wolff a établi quel était, dans la majorité des cas, le mécanisme de la réaction fournie par certains végétaux avec l'iodure de potassium amidonné.

Il a observé que *l'acidité de la pomme, qui n'empê-*

che pas par sa nature l'action oxydasique, à une fonction très intéressante, car elle permet la production de phénomènes de réduction qui sont sous la dépendance de la formation du pigment. En effet, le départ d'iode que l'on observe en humectant la tranche de pomme avec de l'iodure de potassium amidonné est dû à ce que le pigment formé par l'oxydase a été réduit par l'hydrogène de l'acide iodhydrique, mis lui-même en liberté par l'acide du fruit. (60)

L'expérience suivante de cet auteur prouve que la présence du pigment est nécessaire à la manifestation du phénomène.

Dans un tube à essai, on introduit une tranche mince de pomme ou de poire, en même temps qu'un petit tube contenant de l'iodure de potassium amidonné et, après avoir fait le vide, on scelle le tube à la lampe. Si on renverse le tube à essai, de façon à mettre le réactif en contact avec la tranche de fruit, il n'apparaît aucune coloration bleue, mais elle se produit dès qu'on met le contenu du tube au contact avec l'air.

M. J. Wolff a reproduit in vitro et artificiellement des phénomènes comparables à ceux qui viennent d'être décrits, en s'adressant à des composés chimiques, tels que l'hydroquinone et le gayacol, dont les produits de transformation oxydasique se comportent exactement comme le pigment de la pomme ou de la poire. *A deux centimètres cubes d'une solution d'hydroquinone, à 2 gr. par litre, on ajoute une goutte d'extrait glycéринé de Russula delica, puis au bout de 4 à 5 minutes, 2 gouttes d'iodure de potassium amidonné à 5 pour 100 et 3 gouttes d'acide sulfu-*

rique N/10. Le bleuissement se produit presque instantanément et devient rapidement intense.

L'auteur a obtenu les mêmes résultats avec les produits d'oxydation de l'hydroquinone: la quinone et la quinhydrone.

De ses recherches, M. J. Wolff conclut que *dans la grande majorité des cas, la coloration bleue qu'on observe dans les sucs végétaux frais, à l'aide du réactif à l'iodure de potassium amidonné n'est due ni à la présence de peroxydes, ni à celle de nitrites, mais qu'elle est la résultante d'un phénomène complexe où un composé phénolique joue le rôle capital* et que pour obtenir cette coloration, il faut faire intervenir *en dehors du réactif ioduré trois facteurs indispensables : 1° un diphénol, 2° une oxydase, la laccase, 3° un acide, quelquefois un sel acide suffit. Si l'un des trois facteurs fait défaut, on n'observe pas la réaction, mais si on l'ajoute artificiellement au suc, la réaction se produit aussitôt.*

Cette découverte de M. J. Wolff restreint encore la portée de la théorie des oxydases-peroxydes.

Théorie des oxydases systèmes oxygénase-peroxydase

Théorie BACH et CHODAT.

MM. Bach et Chodat (61) constatèrent qu'il était impossible de faire cadrer certains phénomènes d'oxydation diastasique avec la théorie des oxydases-peroxydes. Les oxydases type laccase oxydent la teinture récente de résine de gayac et le gayacol que n'oxyde pas le peroxyde

d'hydrogène; elles donnent avec le pyrogallol un précipité de purpurogalline qu'il est impossible d'obtenir avec l'eau oxygénée. Ces faits et d'autres encore conduisirent les auteurs à considérer les oxydases comme *des mélanges de deux ferments, l'un analogue au peroxyde d'hydrogène serait le peroxyde organique, c'est l'oxygénase, l'autre, dont il serait difficile de débarrasser l'oxygénase qui l'entraîne plus ou moins lorsqu'on la précipite, serait une peroxydase ayant comme effet d'activer l'action de l'oxygénase, comme la peroxydase du raifort ou de la pomme de terre active l'eau oxygénée.*

Dans une note (62) MM. Chodat et Bach précisent leur conception de l'oxygénase : *On connaît actuellement deux classes de corps qui interviennent dans les oxydations biologiques; les peroxydes du type H—O—O—H dans lesquels l'hydrogène peut être remplacé en totalité ou en partie par un radical organique ou inorganique $\text{R} < \begin{smallmatrix} \text{O} \\ | \\ \text{O} \end{smallmatrix}$.* Nous avons nommé oxygénases les peroxydes de ce type, capables de présenter les caractères d'un ferment (destruction par la chaleur — inhibition par les poisons — précipitation par l'alcool).

En 1910, M. Chodat écrivait : *On désigne sous le nom d'oxygénase le composé hypothétique organique ou albumineux des oxydases qui fixe l'oxygène de l'air en donnant un peroxyde de formule générale $\text{F} < \begin{smallmatrix} \text{O} \\ | \\ \text{O} \end{smallmatrix}$.* En d'autres termes, ce sont des corps genre ferments qui peuvent s'unir à l'oxygène de l'air pour donner un peroxyde. Comme les autres corps du genre ferment, ils sont détruits par la chaleur, précipités par l'alcool concentré, ils peuvent être empoisonnés et « endommagés ». Ils ne se

distinguent des peroxydes ordinaires que parce qu'ils sont vraisemblablement des corps de poids moléculaire très élevé.

Quelques années plus tard, M. Bach (9) donne trois preuves expérimentales de l'exactitude de la théorie des oxydases systèmes oxygénase-peroxydase :

Quelques oxydases sont dédoublées par précipitation fractionnée et dialyse en deux ferments solubles, inactifs isolément sur l'émulsion de gayac, mais actifs sur cette émulsion quand ils sont mélangés ;

Les oxygénases isolées et inactives deviennent actives par addition de peroxydases étrangères ;

Des substances, ayant présenté avec intensité la réaction des oxydases et ne la fournissant plus après un certain temps, la présentent de nouveau par addition de peroxydes.

Théorie de M. DONY-HENAULT (46).

L'auteur rappelle que la laccase active l'oxydation de corps autoxydables (résine de gayac, polyphénols). Il estime que cette accélération est due à ce que la laccase est un couple catalytique.

C'est à M. Dony-Hénault que nous devons la notion du couple catalytique. Sous ce nom, il désigne un système de deux catalyseurs qui, séparément, activent une même réaction. L'effet du couple n'est pas la somme des effets de chacun des deux constituants, il est le produit de cette somme par un facteur N. Ce fait explique que le résultat, à peine perceptible d'une réaction, devient très sensible par addition d'un couple catalytique.

L'auteur a activé l'oxydation de polyphénols en les traitant par une solution alcaline ou par une solution d'un sel manganeux et il a constaté que l'activation était notablement plus intense quand on fait agir simultanément les deux solutions sur les polyphénols. De ces expériences, il conclut que les deux constituants du couple catalytique laccase sont les molécules manganeuses et les hydroxyles ions.

L'auteur reconnaît que les résultats expérimentaux qu'il a obtenus n'excluent pas la possibilité de l'existence d'autres facteurs oxydants dans la laccase. *Les phénomènes d'adsorption, de floculation qui jouent un rôle si important dans la chimie des colloïdes interviennent certainement pour donner, lors de l'addition de l'alcool, dans le milieu complexe salin et colloïde constitué par un suc végétal un coagulum où se réunissent tous les éléments présents dans le milieu et, ajoute M. Dony-Hénault, on ne peut affirmer que l'un quelconque des éléments complexes qui constituent la laccase n'intervient pas pour activer l'oxydation des polyphénols. Cependant, l'auteur estime qu'aucun indice sérieux ne prouve que cette intervention supplémentaire de celle du couple catalytique soit importante, puisqu'une trace d'acide suffit à paralyser la laccase et que le rôle de cette trace d'acide est de neutraliser l'alcali, l'un des éléments du couple.*

En résumé, d'après M. Dony-Hénault, la laccase est un couple catalytique — dont les deux constituants essentiels sont les molécules manganeuses et les hydroxyles ions — et c'est à ce titre qu'elle accélère l'oxydation de « substances autoxydables ».

Théorie de MM. J. WOLFF et E. de STÖCKLIN.

Ces auteurs constatent (43) que dans son étude sur les oxydases M. Dony-Hénault *n'a guère considéré que le rôle actif des ions OH et a par trop négligé ce facteur essentiel des actions diastasiques: le catalyseur.*

Pour eux, le phénomène d'oxydation dans lequel intervient l'oxydase ou son équivalent artificiel se passe en deux temps:

1° *Fixation d'oxygène sur un substratum donné par suite de conditions chimiques favorables, c'est ce qu'Engler et Herzog (63) appellent l'autoxydation;*

2° *Phase oxydasique proprement dite provoquée par l'intervention du catalyseur ayant pour fonction d'accélérer la réaction et de l'orienter dans une direction déterminée. Le catalyseur en l'espèce est l'enzyme ou son équivalent artificiel.*

La première partie du phénomène nous apparaît comme une réaction physico-chimique normale, s'effectuant à la faveur d'ions OH provenant de l'hydrolyse de sels à réaction alcaline présents dans toutes les réactions que nous avons relatées.

La seconde phase est, semble-t-il, d'ordre purement physique, c'est une action catalytique au premier chef. Il ne suffit pas toujours pour qu'elle s'exerce qu'elle trouve la réaction commencée, il faut encore, parfois, que certains éléments comme le manganèse ou des groupements phosphorés interviennent pour exciter la catalyse ou lui préparer le terrain... Le phénomène d'oxydation peut donc comporter trois facteurs, dont deux, l'élément électro-négatif OH et l'enzyme sont toujours obligatoires.

Théorie de M^{me} WOKER (51).

D'après l'auteur, l'oxydase qui fixe l'oxygène moléculaire avec production de peroxydes, la peroxydase qui mobilise l'oxygène faiblement combiné des peroxydes, la catalase qui décompose l'eau oxygénée avec mise en liberté d'O² et la perhydridase qui transporte l'hydrogène faiblement combiné sur des matières facilement réductrices ne seraient qu'un seul ferment de nature aldéhydique se comportant différemment suivant les conditions de milieu.

En s'appuyant sur la théorie de l'oxydation lente de Bach-Engler, M^{me} Woker admet que sous l'action de l'oxygène moléculaire, ce ferment-aldéhyde donne un peroxyde organique $R. H. C. < \begin{smallmatrix} O-OH \\ OH \end{smallmatrix}$ qui prendrait aussi naissance dans l'action du ferment sur l'eau oxygénée. Dans le premier cas, le ferment fonctionne comme oxydase, dans le deuxième comme peroxydase. En l'absence d'une matière oxydable, le peroxyde organique formé agit sur l'eau oxygénée en excès, il y a dégagement d'oxygène moléculaire, le ferment fonctionne alors comme catalase. En présence de matières organiques, le ferment effectue les oxydations connues. La fonction perhydridase est en rapport avec les propriétés réductrices des aldéhydes.

Objection de M. BACH (15).

M. Bach réfute la théorie de M^{me} Woker.

Il a établi expérimentalement que les ferments oxydants et réducteurs ne sont pas des aldéhydes et que la

peroxydase n'est identique ni à la catalase, ni à l'oxydase, ni à la perhydridase.

Théorie de TRAUBE.

Traube admet l'existence de ferments qui peuvent oxyder un corps et en même temps en réduire un autre, à l'aide des éléments de l'eau. Il donne à ces ferments le nom de « Reduktions fermente » qui ne rappelle qu'une partie de leur action.

Théorie de BATTELLI et M^{lle} STERN (64).

M. Battelli et M^{lle} Stern admettent que *les ferments oxydants et les ferments réducteurs sont identiques.*

Ils ont vérifié cette hypothèse expérimentalement. Ils ont fait dans ce but un grand nombre de recherches en examinant les effets des principaux catalyseurs oxydants existant dans les tissus des animaux supérieurs. Au mélange du tissu et de la substance oxydable, ils ont ajouté une solution de thionine qui, en se transformant en leucobase, indique la déshydrogénation de la substance oxydable. Dans la majorité des cas, les auteurs ont constaté *un parallélisme étroit entre le pouvoir oxydant du tissu en présence d'oxygène moléculaire d'une part et l'accélération dans la décoloration de la thionine d'autre part.* Ainsi l'addition d'acide urique au tissu contenant l'uricoxydase exerce un effet accélérateur sur la formation de la leucobase (12).

M. Battelli et M^{lle} Stern expliquent les résultats qu'ils ont obtenus en utilisant la théorie de Traube modernisée par l'introduction de la notion des ions. Cette théorie avait

déjà été appliquée aux ferments réducteurs, ils l'étendent aux ferments oxydants qui, ajoutent-ils, *devraient aussi être considérés comme des ferments hydrolysants*. Ils considèrent que dans l'action des ferments oxydants, les *oxhydroyles-ions* de l'eau constituent le groupe oxydant, tandis que les *hydrogènes-ions* se portent sur les corps accepteurs d'hydrogène, l'oxygène moléculaire par exemple. Ils se distinguent ainsi des autres ferments hydrolysants et hydratants uniquement par le fait que sous l'action des ferments oxydants ou réducteurs, l'*oxhydroyle-ion* se fixe sur la molécule d'un corps et l'*hydrogène-ion* sur la molécule d'un autre corps. Dans l'action des autres ferments, au contraire, les deux ions de l'eau se fixent sur deux groupes de la même molécule en produisant l'hydratation ou la scission de la molécule.

On peut admettre que dans l'action des ferments oxydants, il y a formation d'eau oxygénée, lorsque l'*hydrogène-ion* se combine avec l'oxygène moléculaire.

Pour certains auteurs, les oxydases sont donc des activateurs d'oxygène; pour d'autres, oxydases et ferments réducteurs sont identiques et provoquent des réactions chimiques en mobilisant les *hydroxyles-ions* et les *hydrogènes-ions* de l'eau.

Si des hypothèses nombreuses et variées ont été formulées pour expliquer le mécanisme de l'action des oxydases, des opinions également nombreuses et diverses ont été émises sur le mécanisme de l'oxydation.

Weyl estime que l'oxydation se fait par élimination d'hydrogène à l'état d'eau, elle consiste donc en un appauvrissement de la molécule oxydée en hydrogène (18).

M. Effront (50) écrit: *Les oxydases facilitent l'oxydation de certaines substances soit en les déshydratant, soit en compliquant leur molécule par fixation d'oxygène.*

Des recherches instituées pour établir le mécanisme de l'action des oxydases et celui de l'oxydation qu'elles provoquent, il semble ressortir que ces diastases n'ont pas une formule unique de travail et que l'oxydation détermine des modifications variées dans les molécules oxydées.

INFLUENCE DE DIVERS AGENTS PHYSIQUES ET CHIMIQUES SUR LES FERMENTS SOLUBLES OXYDANTS DIRECTS

Quand on parcourt les comptes rendus des travaux consacrés à l'étude de l'influence des agents physiques et chimiques sur les oxydases, on est frappé de la sensibilité de ces diastases aux actions étrangères et de la discordance des résultats expérimentaux obtenus.

Cette discordance reconnaît plusieurs causes :

1°. La non identité de la composition chimique du « matériel oxydasique » employé. Quelques oxydases seulement ont été isolées à l'état de « poudre-ferment », c'est-à-dire, dans un assez grand état de pureté. La plupart d'entre elles ont été étudiées « in situ », par conséquent, dans un milieu de composition chimique essentiellement variable. Or, les résultats obtenus dans l'étude de l'influence des solutions d'électrolytes sur les oxydases isolées à l'état de poudre-ferment prouvent que les constituants du milieu interviennent sûrement dans une réaction oxydasique.

De la nature et de la proportion de ces constituants dépendent le sens et la valeur de cette intervention.

2° La non spécificité de l'action d'un agent: un même agent peut être activant ou empêchant vis-à-vis d'une même oxydase. Le sens de son action dépend du corps oxydable vis-à-vis duquel cette action est étudiée.

I. — Influence des agents physiques : chaleur, viscosité, lumière.

1° Influence de la chaleur.

Les travaux consacrés à l'étude de cette influence sont peu nombreux.

Ils ont établi que les oxydases, comme les autres diastases, possèdent une « température optima » et une « température mortelle ».

Ils ont montré que l'influence de la chaleur dépend de divers facteurs:

De l'origine de l'oxydase, la tyrosinase du *Solanum tuberosum*, et celle du *Russula delica* ont des températures mortelles différentes (Staub 66);

De la nature du solvant ; toutes choses égales d'ailleurs, la température mortelle d'une oxydase varie de quelques degrés suivant qu'elle est en milieu aqueux ou glyciné.

M. Dony-Hénault a établi le rôle des matières albuminoïdes dans l'action de la chaleur sur les oxydases artificielles. Il a préparé deux laccases artificielles possédant toutes deux le pouvoir oxydant de la laccase naturelle, l'une contenait des matières albuminoïdes et était détruite par la chaleur, l'autre en était exempte et résistait à l'action de cet agent. En l'absence de matière albuminoïdes les oxydases de synthèse résistent donc à la chaleur.

La grande analogie existant entre les oxydases artificielles de l'auteur et la laccase permet, semble-t-il, d'étendre à celle-ci les conclusions expérimentales applicables aux premières.

M. Dony-Hénault estime que le mécanisme de l'action des matières albuminoïdes est le suivant: en présence d'eau, sous l'action de la chaleur et des ions hydroxyliques, il y a élimination d'azote ammoniacal, aux dépens des matières albuminoïdes, d'où diminution de l'alcalinité du système, diminution des ions OH l'un des facteurs du couple catalytique qui, dans la théorie de l'auteur, constitue les oxydases.

2° Influence de la viscosité du milieu.

Le premier, M. ACHALME a montré que *les variations de viscosité exercent une influence énorme sur l'activité diastasique, influence telle que les autres facteurs semblent relégués au second plan* (67).

Les travaux, encore peu nombreux, consacrés à l'influence de la viscosité sur les oxydases semblent établir que cette influence est retardatrice, ou paralysante.

M. GESSARD (68) signale que la viscosité du milieu ajourne l'action de la tyrosinase sur la tyrosine : ... *si dans nos expériences, on substitue la glycérine à l'eau comme dissolvant de la tyrosine... il n'y a plus de coloration.*

M. AGULHON (69) a observé que la viscosité du milieu protège la laccase et la tyrosinase contre l'action des rayons ultra-violet.

3° Influence de la lumière.

Elle semble n'avoir été l'objet que de quelques recherches.

M. AGULHON (70) a constaté que *la lumière visible est active sur la laccase et la tyrosinase, seulement en présence d'oxygène, elle agit par oxydation, il y a probablement formation d'eau oxygénée, mais seulement en présence d'oxygène libre.*

La lumière violette, plus active, est susceptible de décomposer l'eau avec formation d'eau oxygénée, aussi détruit-elle ces diastases en solution aqueuse, même en l'absence d'oxygène.

II. Influence de divers agents chimiques (solutions aqueuses d'électrolytes)

L'étude de cette influence a été l'objet de travaux nombreux, dont les résultats ne sont pas toujours concordants. Cette divergence des résultats est due, le plus souvent, à ce que les auteurs n'ont pas tenu suffisamment compte de l'avis donné par M. G. Bertrand: *Il faut étudier avec soin la composition qualitative et quantitative du milieu dans lequel s'accomplit une réaction diastasique, avant de conclure à l'influence paralysante, activante ou nulle d'un corps ajouté* (71).

1° Influence des acides.

Les acides minéraux exercent une action nettement défavorable sur la plupart des oxydations diastasiques. A dose suffisante, ils s'opposent à ces oxydations; la plus faible dose empêchante a reçu le nom de « dose mortelle ».

Plusieurs théories ont été émises pour expliquer le mécanisme de l'action des acides sur les oxydases, elles sont en relation avec les diverses hypothèses formulées à propos de la constitution chimique de ces diastases.

M. G. Bertrand estime que le rôle paralysant des acides minéraux sur les oxydases, type laccase, est dû à la formation de sels de manganèse *non dissociables électrolytiquement*. *Et du moment où le manganèse ne peut plus se transformer en protoxyde par hydrolyse, toute l'action diastasique doit s'arrêter.*

M. J. Wolff ramène l'action nuisible des acides à une neutralisation. *On conçoit bien pourquoi des doses infimes d'acides minéraux ont pour effet de paralyser ou de retarder l'action des oxydases. En effet, ces acides neutralisent une partie ou la totalité des sels alcalins qui entrent dans la composition du mélange complexe qu'est l'oxydase.* (72).

Suivant M. Dony-Hénault, les acides neutralisent les ions OH qui sont l'un des éléments du couple catalytique laccase.

2° Influence des alcalis.

Les alcalis, à très faibles doses, exaltent, le plus généralement, l'activité des oxydases. Ils agissent par les ions OH qu'ils introduisent dans le milieu.

D'après certains auteurs, ces ions OH interviennent dans le premier temps du phénomène d'oxydation, dans la fixation d'oxygène sur le substratum donné, par suite de conditions chimiques favorables.

M. J. Wolff signale *dés cas où le milieu alcalin n'est pas favorable à l'oxydation* (73). Ce milieu peut avoir une action empêchante ou simplement retardatrice.

3 Influence des sels

De nombreuses recherches ont été faites pour établir l'influence des sels sur les phénomènes oxydasiques.

Elles ont établi que :

Un sel peut ne favoriser qu'une seule des oxydations provoquées par une oxydase ;

Un sel peut activer une réaction oxydasique, susceptible de s'accomplir sans lui (le phosphate disodique active l'oxydation de l'alizarine par les macérations glycélinées de *Russula delica* — oxydation pouvant s'effectuer en son absence) ;

Un sel peut être nécessaire à la production d'un phénomène oxydasique (l'oxydation du bolétol par l'oxydase des champignons n'est possible qu'en présence de sels alcalins ou alcalino-terreux.) (74)

Les sels ont aussi une influence sur les oxydases artificielles. L'oxydation d'un corps par une oxydase de synthèse est rendue possible ou peut être activée par un sel spécial. Un sel ferrique est nécessaire pour que la laccase artificielle de M. Dony-Hénault oxyde le gayacol; le phosphate disodique active l'oxydation de l'hydroquinone par le ferrocyanure de fer colloïdal (J. Wolff).

Des travaux effectués jusqu'à ce jour, il ressort que le rôle paralysant ou activant des sels ne semble pas devoir être attribué à des ions particuliers. Les sels qui possèdent une influence activante présentent quelques caractères communs. M. J. Wolff a constaté qu'ils sont tous facilement hydrolysables, faiblement alcalins et qu'ils fixent l'oxygène sur quelques polyphénols. (75)

Des recherches ont été entreprises pour savoir s'il existe des relations entre l'hydrolyse des sels et leur influence sur les phénomènes oxydasiques.

M. Bach et M^{lle} Maryanovitch ont observé *qu'entre l'hydrolyse des sels et leur faculté d'exercer une action sur le pouvoir oxydant de la phénolase, il n'existe pas une relation directe. L'hydrolyse des sels n'est qu'un des facteurs qui produisent l'influence observée.* (96)

M. J. Wolff (65), par des voies différentes, aboutit à une conclusion identique. Il a étudié les relations qui existent entre le degré d'hydrolyse de différents sels et leur pouvoir de fixation de l'oxygène en présence de ferrocyanure de fer colloïdal. Ce composé, présentant dans des conditions expérimentales précises le pouvoir oxydant des oxydases, il est logique d'appliquer à ces diastases les résultats obtenus dans son étude.

M. J. Wolff conclut de ses expériences : « *Si l'on doit attacher une certaine importance à la relation qui existe entre l'hydrolyse d'un sel et sa propriété de fixer l'oxygène, il y a encore d'autres facteurs qui interviennent, et il ne faut pas tout faire dépendre de l'hydrolyse.* »

Le sens et la valeur de l'action d'un sel sur un phénomène oxydasique semblent dépendre de la masse de sel employée. M. J. Wolff (65) a établi que dans certaines oxy-

dations effectuées par la macération glycérinée de *Russula delica* « il existe, pour une quantité déterminée d'enzyme, une dose optima de phosphate bibasique au-dessus de laquelle toute addition reste sans effet et peut même devenir nuisible. »

Mécanisme de l'action des sels

Plusieurs théories ont été émises pour expliquer le mécanisme de l'action des sels dans les phénomènes oxydasi-ques.

Théorie de l'existence de pro-dia- stases.

Les substances inorganiques dont la présence est nécessaire pour la manifestation de certaines actions diastasi-ques ont reçu les noms de co-enzymes, co-dia-
stases. Pendant longtemps, on a admis que leur rôle était de transformer une pro-dia-
stase en dia-
stase. A l'heure ac-
tuelle, on n'accepte plus cette interprétation du méca-
nisme de l'action des co-enzymes. En effet, il est difficile d'admettre que dans les exemples cités précédemment, les sels alcalins ont créé l'oxydase des champignons qui agira sur le bolétol et que le sel ferrique a créé la laccase arti-
ficielle qui oxydera le gayacol.

Théorie des partisans de la nature colloïdale des dia- stases.

Les partisans de cette théorie admettent que les diffé-
rents ions produits par l'hydrolyse des sels interviennent en se fixant, par adsorption, sur les granules colloïdaux auxquels ils communiquent des propriétés particulières.

Théorie de M. BACH.

M. Bach admet que les sels activants sont ceux qui activent la réaction fondamentale (78) : « *dans la plupart des cas, l'état du milieu ne se répercute sur l'action de la phénolase que pour autant qu'il intéresse la réaction fondamentale.* Si la phénolase, ajoute l'orateur, n'oxyde l'orcine qu'en milieu alcalin, ce n'est pas parce que l'alcalinité du milieu est nécessaire à la manifestation de l'action oxydante de la phénolase, mais parce que l'orcine ne s'oxyde spontanément, au contact de l'air, qu'en milieu alcalin.

Objections de M. J. WOLFF.

M. J. Wolff fait deux objections à cette théorie :

1° la dose d'un sel activé sur une oxydase, est inactive sur la réaction fondamentale ;

2° un sel, actif sur la réaction fondamentale, peut être sans action sur la réaction oxydasique, c'est ainsi que le citrate trisodique, qui active l'oxydation spontanée de l'hydroquinone, ne permet pas l'oxydation de ce polyphénol par le ferrocyanure de fer colloïdal (j'ai dit précédemment pourquoi il était rationnel de conclure des réactions de ce composé, à celles des oxydases).

Théorie de l'action des ions sur le substratum de transformation

D'après cette théorie, les ions libérés par l'hydrolyse des sels agiraient, non pas sur la diastase, mais sur le corps qu'elle transforme.

Des expériences montrent en effet que *la substance qui subit l'action de l'enzyme est plus sensible aux influences du milieu que l'enzyme lui-même* (79). C'est ainsi que les macérations glycerinées de *Russula delica* oxydent le gayacol facilement en présence de phosphates acides, difficilement en présence de diphosphates, alors qu'elles oxydent la cochenille, l'orcine et diverses substances facilement en présence des diphosphates et difficilement en présence des phosphates acides.

MM. Victor Henri et Wurmser ont réalisé de très ingénieuses expériences dont les résultats sont une preuve décisive en faveur de la théorie que nous exposons. Ils ont étudié l'influence de doses faibles d'acides, d'alcalis et d'autres substances sur les vitesses de réaction et de décomposition de l'eau oxygénée par les rayons ultra-violet. Ils ont constaté l'action retardatrice ou paralysante des corps étudiés; or, on ne peut admettre que ceux-ci agissent sur l'agent de transformation, le rayon ultra-violet; ils agissent nécessairement sur la substance transformée, l'eau oxygénée. Si nous rappelons que M. Daniel Berthelot a pu reproduire avec la lumière ultra-violette certaines réactions diastasiques, on peut, logiquement, des caractères des actions produites par cette lumière, conclure aux caractères des actions diastasiques.

Il est donc possible d'envisager l'action des co-ferments comme se produisant... sur le corps à transformer et non sur le ferment, de façon à rendre le corps, soit apte à être attaqué par un catalyseur qui est le ferment, soit au contraire, résistant à son action.

Théorie de MM. J. WOLFF et de STÖCKLIN

Ces deux auteurs admettent que le rôle favorisant des sels peut être double, ils peuvent agir comme générateurs d'ions OH par leur alcalinité et comme co-enzymes s'il renferme l'élément nécessaire à la mise en œuvre du catalyseur principal, dans le cas où la présence d'un co-enzyme est nécessaire.

Action des sels sur les produits de l'oxydation diastasique

On doit à M. Gessard une notion nouvelle sur le rôle de quelques sels dans les actions oxydasiques. De ses recherches sur l'influence des sels dans l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase, il conclut que certains sels peuvent ne pas intervenir dans le phénomène oxydasique lui-même, mais concourir à la transformation ultérieure des produits d'oxydation.

Des expériences réalisées par M. Bach confirment les conclusions de M. Gessard. M. Bach a observé que la lac-case agit sur le pyrogallol avec formation lente de purpurogalline et qu'en présence de sulfate d'alumine, cette formation est rapide.

L'auteur a établi que le sel n'intervient pas dans le phénomène oxydasique, puisqu'il provoque une forma-

tion rapide de purpurogalline au dépens du produit jaune formé soit dans l'oxydation spontanée du pyrogallol au contact de l'air, soit dans l'oxydation du pyrogallol par l'eau oxygénée.

De cet exposé, il ressort donc que des travaux doivent encore être effectués pour permettre de formuler des conclusions générales sur l'influence des sels dans les phénomènes oxydasiques.

CORPS TRANSFORMÉS PAR LES FERMENTS SOLUBLES OXYDANTS DIRECTS

Les corps sur lesquels les oxydases agissent « in vitro » possèdent un ou plusieurs hydrogènes facilement mobilisables : hydrogène aminé, phénolique ou alcoolique. La plupart de ces corps appartiennent à la série aromatique.

Toutes les oxydases n'oxydent pas « in vitro » les mêmes corps. La tyrosinase est sans action sur l'acide gayaconique, le gayacol, l'hydroquinone et le pyrogallol qu'oxydent la laccase et les oxydases type laccase, et celles-ci n'oxydent pas la tyrosine. En raison de ces faits, on croyait qu'à la différence dans les actions correspondait une différence dans les constitutions des oxydases.

Récemment, MM. Chodat et Freedericks, par addition d'un co-enzyme convenable, ont pu communiquer à la laccase pure la propriété d'agir sur la tyrosine et le p-crésol ; ils lui ont donc donné un pouvoir tyrosinase. Les résultats obtenus par les deux auteurs laissent supposer que les différences dans les actions des oxydases sont dues à des différences dans les co-enzymes et non à des différences dans les constitutions des diastases.

Nous ignorons la plupart des corps susceptibles d'être oxydés « in vivo » par les oxydases, car, des corps qu'elles oxydent « in vitro » quelques-uns seulement se rencontrent chez les êtres vivants.

PRINCIPALES OXYDASES VÉGÉTALES ET ANIMALES

I. — Oxydases végétales

Elles sont les mieux connues, peut-être parce qu'elles sont très souvent accompagnées dans les substances qui les renferment par un corps qu'elles oxydent avec production d'une coloration. Cette coloration attire l'attention et invite à la recherche de l'oxydase.

LACCASE

L'étude détaillée de la laccase a été faite dans maintes publications, notamment dans l'importante thèse de P. Sée, aussi, me bornerai-je à rapporter ici les points essentiels de l'histoire de cette diastase.

HIKOROKURO YOSHIDA a pressenti l'existence d'une diastase oxydante dans l'*Urushi* extrait du *Rhus vernicifera*, et le rôle de ce ferment soluble dans la formation de la laque du Japon.

En 1893, M. G. BERTRAND a isolé du latex du *rhus succedanea* (Anacardiacees) une diastase oxydante, à laquelle

il a donné le nom de laccase (1) pour rappeler son origine. et sa nature diastasique. De ce même latex, M. G. Bertrand a isolé un produit à caractère phénolique qu'il a appelé laccol et qui est oxydé par la laccase.

Préparation de la laccase.

On utilise la solubilité de la laccase dans l'eau, son insolubilité dans l'alcool fort et la solubilité du laccol dans ce solvant.

Le latex est délayé dans un grand excès d'alcool; le laccol se dissout, la laccase précipitée est séparée par filtration et purifiée par dissolution dans l'eau et précipitation par l'alcool fort. On la dessèche dans le vide. La laccase ainsi préparée est une substance blanche, amorphe.

Composition chimique de la laccase.

M. G. Bertrand attribue à la laccase la composition chimique moyenne suivante :

Eau.	7,4 %
Gomme	86,77 %
Azote	0,41 %
Cendres	5,58 %

Il la considère comme une combinaison instable du manganèse avec un acide faible organique.

M. DONY-HÉNAULT ne reconnaît pas à cette oxydase une composition chimique aussi simple. Il a réalisé des expé-

(1) Le nom de laccase est fréquemment donné à des oxydases ayant une origine différente. Pour éviter toute confusion, je réserverai ce nom à l'oxydase extraite du latex de l'arbre à laque.

riences sur l'entraînement des sels par les colloïdes et il en conclut que : « *la laccase brute représente donc au point de vue chimique et, si l'on peut parler ainsi, la figure composite de toutes les substances du latex.* » (80). Il trouve une autre preuve de la complexité de cette composition chimique dans le fait que le gayacol, oxydé par la laccase, ne l'est pas par des solutions de sels manganoux divers.

Facteur essentiel des oxydations dues à la laccase.

M. G. BERTRAND considère le manganèse comme le facteur essentiel des oxydations provoquées par la laccase.

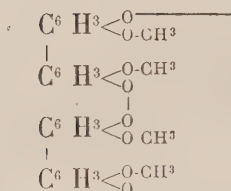
M. DONY-HÉNAULT estime que les ions hydroxyliques interviennent aussi avec intensité dans ces oxydations.

Corps oxydés par la laccase.

M. G. BERTRAND a étudié l'action de la laccase sur de nombreux corps organiques appartenant à diverses fonctions chimiques : aldéhyde, alcool, amine, phénol, etc. De ses recherches, il conclut : *D'une manière générale les composés nettement oxydables sont ceux qui, appartenant à la série cyclique, possèdent au moins deux des groupements OH ou NH² dans leur noyau ou dans lesquels ces groupements sont situés les uns par rapport aux autres, soit en position ortho, soit sur tout en position para* (81).

Cette oxydation consiste en un enlèvement d'hydrogène, l'hydroquinone est transformée en quinone.

Le gayacol, traité par la laccase, donne de la tétragayacoquinone, dont la formule de structure est :



Ainsi, la laccase est susceptible de provoquer, soit uniquement l'oxydation, soit à la fois l'oxydation et la condensation des corps sur lesquels elle exerce son action. Le second cas s'est présenté ici avec un corps dont la molécule renferme un seul oxhydryle phénolique et la condensation a eu pour résultat de fournir précisément comme dans le cas le plus simple de l'hydroquinone, un dérivé à fonction quinonique (82).

M. J. WOLFF a observé que la laccase oxyde très facilement l'hématoxyline, le bleu de quinoline, moins facilement l'orangé Poirrier 1 et l'orcine et qu'elle n'oxyde pas ou presque pas les combinaisons solubles de l'alizarine, la cochenille et la matière colorante de certaines fleurs (83).

MM. G. BERTRAND et MARTINAND (84) ont constaté que la laccase, à la dose de 1 pour 1.000, précipite la matière colorante des vins rouges. Un bouquet et un changement de teinte se produisent en même temps. Ces résultats font supposer aux auteurs que les oxydases type laccase doivent jouer un rôle dans la casse des vins.

INFLUENCE DE DIVERS AGENTS SUR LA LACCASE

1° Influence de la chaleur

La laccase résiste fortement à la chaleur. Son activité ne disparaît que vers 100°.

Les oxydases, type laccase, offrent, elles aussi, une grande résistance à la chaleur, et cette propriété est utilisée pour les séparer de la tyrosinase qui les accompagne souvent. La tyrosinase est détruite par chauffage à 65° (G. Bertrand).

En étudiant l'action de la chaleur sur la laccase artificielle qu'il a préparée, M. Dony-Hénault a établi ce fait intéressant que l'influence de la chaleur dépend, le plus souvent, des corps qui accompagnent *l'élément noble de la diastase*. (85)

• 2° Influence des acides

M. G. BERTRAND a fait une étude systématique de l'action exercée par les acides sur la laccase (86). L'auteur a constaté que *ces réactifs pouvaient être divisés en deux groupes: celui des acides qui, à des doses extraordinairement petites arrêtent l'action oxydante du ferment soluble et celui des acides qui au contraire peuvent être considérés comme inactifs, étant pour ainsi dire sans effet malgré la concentration. Les acides du premier groupe agissent en quantités proportionnelles à leur poids moléculaire, inversement proportionnelle à leur degré de basicité, une molécule d'acide acétique par exemple agit autant qu'une molécule d'acide chlorhydrique et une demi-molécule de $\text{SO}^4 \text{H}^2$. Ainsi conclut l'auteur au point de vue de leur action sur la laccase, il existe dans les acides deux types d'hydrogène fonctionnel, l'un doué d'une activité considérable pouvant à des doses infinitésimales arrêter toute oxydation, l'autre inactif ou pour ainsi dire inactif.*

Les hydrogènes actifs dégagent au moins 12 cal. 5

quand on les remplace par du sodium, les autres dans les mêmes conditions, dégagent au maximum 11 cal. 5.

Dans ses recherches, l'auteur a utilisé, comme réaction d'épreuve, la transformation du gayacol en tétragayacoquinone. Il a opéré, à la température de 22 à 23°, avec une laccase très active à la dose de 1/250.000, et donnant en 24 heures, une réaction très nette avec une solution aqueuse de gayacol à 1 pour 100.

M. G. Bertrand a étudié l'influence sur la laccase:

1° D'acides monobasiques, acides chlorhydrique, formique, acétique, butyrique;

2° D'acides bibasiques, acides sulfurique, oxalique, tartrique;

3° D'acides tribasiques, acides borique, phosphorique, arsénique, citrique.

L'acide oxalique s'est montré un peu plus actif que les acides sulfurique et tartrique. Avec une solution d'acide oxalique N/5000, il n'y a pas formation de précipité de tétragayacoquinone, avec une solution d'acide sulfurique N/5000, on a un précipité et avec une solution d'acide tartrique de même concentration, il n'y a qu'un commencement de précipité.

Je rapporterai les résultats obtenus par l'auteur dans l'étude de l'action de l'acide sulfurique sur la laccase, ils sont particulièrement révélateurs de la sensibilité de l'oxydase à l'action de cet acide,

Une solution d'acide	N/1.000	supprime le pouvoir oxydant d'une solution de laccase à	1 p. 2.000
—	N/2.000	— — —	1 p. 4.000
—	N/10.000	— — —	1 p. 20.000
—	N/20.000	— — —	1 p. 40.000
—	N/60.000	— — —	1 p. 200.000

M. G. Bertrand signale que les faits révélés par cette étude apportent une notion nouvelle à la connaissance, encore très imparfaite, de la constitution chimique de la laccase... Nous ignorons tout du radical électro-négatif lié au métal. L'étude de l'action des acides sur la laccase nous permet, aujourd'hui, d'évaluer le degré d'activité chimique de ce radical, de le ranger approximativement à côté du diméthylaminobenzène sulfone.

Est-ce un acide de la série des polysaccharides, est-ce un acide aminé, une substance protéique? C'est un point au sujet duquel nous sommes, pour le moment, réduits aux suppositions.

L'auteur rappelle que, d'après des recherches précédentes on peut concevoir, non pas une oxydase, mais une série d'oxydases manganeuses différant les unes des autres par le radical électro-négatif.

M. G. Bertrand a utilisé une oxydase très active, et très pauvre en substances minérales, d'où les résultats très nets qu'il a obtenus. Il en serait autrement, dit-il, si l'on opérait avec des sucres cellulaires riches en sels. Une petite quantité d'acide acétique ou d'acide sulfurique pourrait être sans effet, simplement parce que l'acide aurait été neutralisé, au sens de l'action antidiastatique, par la présence d'un sel, d'un acide inactif, comme un phosphate ou un citrate.

3° Influence de l'eau oxygénée

M. GESSARD (87) a observé que, suivant sa concentration, l'eau oxygénée empêche, retarde ou atténue la coloration

bleue que la laccase fournit avec la teinture alcoolique récente de résine de gayac.

RÔLE DE LA LACCASE

Son seul rôle connu est d'intervenir dans la formation de la laque du Japon, en oxydant un corps qui, d'après les travaux de M. G. Bertrand, semble être le laccol.

Remplit-elle un rôle physiologique dans l'arbre à laque? Aucun fait d'observation, aucune expérience ne nous autorise, jusqu'à ce jour, à conclure par l'affirmative.

Des chercheurs sont allés jusqu'à contester sa présence dans le latex des arbres à laque. M. DONY-HÉNAULT a écrit: *La laccase est une création accidentelle de la précipitation alcoolique. Elle n'est qu'une association fortuite de catalyseurs minéraux* (31).

TYROSINASE

La tyrosinase (1) est l'oxydase qui oxyde la tyrosine avec production d'une matière colorante rouge soluble et formation ultérieure d'un précipité noir, si certaines conditions expérimentales sont réalisées. Cette action sur la tyrosine, lui a valu son nom.

Chronologiquement, la tyrosinase est le deuxième représentant des oxydases.

Sa présence a été signalée pour la première fois dans l'organisme végétal par M. G. BERTRAND (7). C'est par

(1) La tyrosinase est généralement rangée parmi les oxydases végétales, bien qu'elle se rencontre dans le règne animal.

erreur qu'on associe parfois Bourquelot à la découverte de cette oxydase. Le mérite *d'avoir introduit la notion de la tyrosinase dans la science* ne revient qu'à M. G. Bertrand.

M. BIEDERMANN (89) a découvert la tyrosinase dans l'organisme animal.

Cette oxydase existe dans de nombreux végétaux supérieurs et inférieurs. Elle est particulièrement fréquente chez les champignons. Elle est localisée dans des régions très limitées des végétaux (chapeau des champignons, pelure des tubercules de pomme de terre, couche à aleurone du grain de blé). Le plus souvent, elle est accompagnée dans les végétaux par d'autres diastases, oxydantes ou non.

Dans le règne animal, la présence de la tyrosinase a surtout été signalée chez les insectes.

M. DEWITZ (90) a constaté l'existence de cette oxydase dans *Lucilia cæsar* au cours de la métamorphosé.

MM. FURTH et SCHNEIDER (91) ont observé la présence de la tyrosinase dans la lymphe des insectes.

M. GESSARD (92) a trouvé cette oxydase chez la mouche dorée, à deux phases de la vie de cet insecte.

M. ROQUES a étudié, chez *Lymnophilus flavicornus*, une oxydase qui semble être une tyrosinase.

Préparation de la tyrosinase.

Cette oxydase est surtout extraite du *Russula delica*, des pelures de pomme de terre et du son de blé.

La tyrosinase des pelures de pomme de terre est exempte de tyrosine, d'oxydases type laccase et de com-

posés susceptibles d'agir sur les acides aminés. L'absence de ces substances permet de l'utiliser pour rechercher la tyrosine dans les produits de la protéolyse des matières albuminoïdes. Toutefois, cette oxydase est accompagnée d'autres diastases: peroxydiastase, catalase, invertine, etc., qui ne semblent gêner en rien l'étude de la tyrosinase (59).

Parmi les principaux procédés de préparation de la tyrosinase, je citerai:

Le procédé G. Bertrand et Muttermilch (94), (tyrosinase du son de froment);

Le procédé Chodat (95), (tyrosinase du *Solanum tuberosum*);

Le procédé Staub (59), (tyrosinase du *Solanum tuberosum*);

Les procédés Bourquelot (97), (tyrosinase du *Russula delica*).

Je donnerai in extenso le mode opératoire de la préparation de la tyrosinase par le procédé G. Bertrand et Muttermilch, et le procédé Staub.

1° Procédé BERTRAND et MUTERMILCH.

Du son de froment mélangé avec quatre parties d'eau est placé dans un flacon que l'on remplit autant que possible et que l'on bouche. On peut prendre de l'eau saturée de chloroforme mais cela n'est pas indispensable. Après quelques heures de macération, ou même une journée si on a la précaution de mettre le flacon à la glacière, on passe le mélange à la presse, à travers un linge. On centrifuge ensuite le liquide pour séparer les particules en sus-

pension. La solution limpide décantée est alors additionnée de trois fois son volume d'alcool à 95 %, on centrifuge de nouveau; le précipité est lavé une fois à l'alcool à 80 %, puis délayé dans l'eau distillée. On laisse en contact pendant quelque temps et l'on sépare, toujours à la centrifugeuse les matières protéiques congelées et la solution diastasique. Celle-ci est traitée par 3 à 4 volumes d'alcool, le précipité qui se forme est rassemblé, lavé à l'alcool fort, enfin desséché dans le vide, sur l'acide sulfurique.

Ce précipité, soluble dans l'eau, ne contient pas de lacase.

2^e Procédé STAUB.

On broie plusieurs kilogrammes de pelures de pommes de terre, humectées d'alcool, au moyen d'une machine à hâcher. Le suc des pulpes broyées est rapidement exprimé à l'aide d'une presse. On le laisse couler dans un récipient contenant de l'alcool fort. Immédiatement, il se forme un précipité volumineux qu'on laisse se déposer pour le recueillir après décantation sur un filtre. On redissout la partie soluble de ce précipité dans un peu d'eau, et précipité à nouveau par de l'alcool. Ce précipité de couleur légèrement jaunâtre est séché rapidement dans le vide. A l'état pulvérisé, il prend une apparence gris clair. Pour éviter une forte oxydation, il faut broyer et exprimer le suc aussi rapidement que possible et à basse température.

Constitution de la tyrosinase.

Tous les auteurs ne considèrent pas la tyrosinase comme une oxydase, ni même comme une diastase unique.

En 1908, M. BACH (98) la juge un système oxygénase-peroxydase dans lequel l'oxygénase peut être remplacée par le peroxyde d'hydrogène, alors que la peroxydase est spécifique.

L'auteur appuie son opinion sur les faits et les raisonnements suivants:

Quand on traite une solution de tyrosinase par du carbonate de magnésie ou de l'alcool méthylique, les produits obtenus n'oxydent que faiblement la tyrosine. Si on les additionne de peroxyde d'hydrogène, il y a production de mélanines, dans un temps relativement très court. Puisque, l'addition du peroxyde d'hydrogène a rendu aux produits ci-dessus la propriété d'oxyder la tyrosine, c'est que le traitement au carbonate de magnésie ou à l'alcool méthylique a eu pour effet d'atténuer l'oxygénase du système.

Or la tyrosine n'est oxydée ni par l'eau oxygénée seule, ni par le système eau oxygénée-peroxydase naturelle.

Il faut donc admettre que la peroxydase de la tyrosinase est une peroxydase spécifique.

En 1914, M. Bach émet l'opinion que la tyrosinase est un mélange d'une aminoacidase (désamidase de Chodat) et d'une phénolase ordinaire (*Sous ce nom l'auteur désigne l'oxydase type laccase des champignons*).

M. CHODAT ne partage pas cette opinion. Il a préparé une tyrosinase de champignons qui n'a plus ni propriété oxydase, type laccase, ni propriété peroxydiastase et qui

agit très activement sur les acides aminés en les désaminant. De ces recherches, l'auteur conclut: *Il n'est donc pas permis de dire que la tyrosinase est un mélange d'aminocidase (désamidase) et de « phénolase ordinaire » (laccase) (99).*

M. GONNERMANN (100) considère la tyrosinase comme un ferment hydrolysant qui décomposerait la tyrosine en donnant un corps oxydable spontanément.

MM. CHODAT et STAUB (101) démontrèrent, à l'aide d'une expérience ingénieuse, que la tyrosinase ne pouvait être rangée parmi les diastases hydrolysantes.

D'après M. HAEHN, on doit considérer la tyrosinase comme un mélange de ferments. Il déduit son affirmation de l'action de la tyrosinase sur la tyrosine. A son avis, une aminocidase transforme d'abord la tyrosine, puis une phénolase introduit un oxhydryle dans le noyau benzénique et enfin des enzymes condensants activés par des sels métalliques forment la mélanine (102).

Influence de la tyrosinase sur diverses substances

1° INFLUENCE SUR LA TYROSINE

L'action de la tyrosinase sur la tyrosine a été l'objet de nombreux travaux.

M. G. BERTRAND a décrit les changements d'aspect que présente, au contact de l'air, la solution de tyrosine, après addition de tyrosinase et il signale que tous ces changements s'accompagnent d'absorption d'oxygène.

M. GESSARD (103) a étudié les RÉACTIONS CHROMOGÈNES qui s'observent dans l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase. Il a réalisé des expériences fort ingénieuses qui lui permettent de conclure: *La tyrosinase oxyde la tyrosine avec production de cette couleur rouge qui est aussi l'effet d'une oxydation chimique (réactif de Millon). Le noircissement, comme la formation de noir, est un phénomène secondaire sous la dépendance d'éléments minéraux qui accompagnent la diastase dans les conditions naturelles et passent avec elle dans ses solutions. On peut désormais obtenir à volonté la production de la matière noire.*

Après avoir établi le rôle indispensable des sels minéraux dans la production de la matière noire, l'auteur cherche à pénétrer le mécanisme de sa formation. Résulte-t-elle d'une réaction chimique ou d'une réaction diastasique?

Des sels divers: phosphates, sulfates, chlorures, ajoutés au mélange tyrosine-tyrosinase (cette dernière est employée en quantité strictement suffisante pour obtenir la coloration rouge) provoquent l'apparition de la matière noire: *L'effet univoque des sels sous leur différence de composition montre bien qu'il ne s'agit pas là d'une action chimique.* L'auteur a constaté qu'en agitant la liqueur rouge avec de la craie ou du talc, on obtient le précipité noir sur ces corps. Il en conclut que les sels, la craie et le talc interviennent en modifiant les conditions d'adhésion de la matière noire au liquide.

Il ne s'agit pas non plus d'une réaction diastasique puisque la chaleur provoque instantanément la décoloration

de la liqueur rouge avec formation et dépôt du précipité noir par refroidissement.

M. Gessard a établi :

1° Le rôle nécessaire du calcium dans l'action de la tyrosinase sur la tyrosine (la nécessité de la présence du calcium rapproche donc la tyrosinase des diastases coagulantes);

2° Le rôle empêchant de l'eau et des sérums d'animaux;

3° Le rôle retardateur des sels sur l'apparition de la coloration rose. L'auteur pense que le temps qui s'écoule avant l'apparition de la coloration est employé à l'accomplissement d'un travail intérieur, que l'insuffisance de nos moyens d'investigation ne nous permet pas de connaître.

M. CHODAT a recherché dans quelle mesure le travail d'oxydation de la tyrosine est précédé de phénomènes préparatoires qui sont *l'union, la combinaison du ferment avec la substance fermentescible, pour laquelle action, il faut un temps déterminé.* Il soumet, pendant une heure à l'action d'un courant d'anhydride carbonique, une solution de tyrosinase additionnée de tyrosine. Cette solution a été au préalable privée d'oxygène. Après une heure, on n'observe aucune coloration, la solution est alors soumise à l'action de l'air. L'oxydation se fait normalement, *mais elle prend pour s'effectuer un temps tout aussi long qu'en temps ordinaire. Il ne semble pas que dans ce phénomène d'oxydation, aucune réaction préparatoire ne se soit faite avant l'arrivée de l'oxygène.*

Ainsi que je l'exposerai dans l'un des paragraphes suivants, M. G. Bertrand et M. G. Chodat ont montré que

c'est sur l'oxhydryle phénolique que doit porter vraisemblablement l'action oxydante de la diastase.

MM. G. BERTRAND et ROSENBLATT (104) ont établi qu'il y a *dans l'action de la tyrosinase sur la tyrosine non pas une relation stéréochimique mais une relation fonctionnelle*. Ils ont traité la tyrosine racémique synthétique par la tyrosinase employée sous forme d'extrait glyciné de *Russula*. Au cours de la transformation de la tyrosine en mélanine, il n'y a pas séparation de la tyrosine droite d'avec la tyrosine gauche. Il y a oxydation simultanée des deux tyrosines, une seule tyrosinase intervient donc dans la réaction.

2° INFLUENCE SUR DES CORPS VOISINS DE LA TYROSINE

M. G. BERTRAND et M. CHODAT ont étudié l'action de la tyrosinase sur des composés de constitution chimique voisine de celle de la tyrosine. Ils aboutissent à la même conclusion quant au point de la molécule oxydée par la tyrosinase.

Travaux de M. G. BERTRAND (105)

M. G. BERTRAND a fait agir la tyrosinase sur les corps suivants: tyrosine, P. oxyphényléthylamine, P. oxyphénylméthylamine, P. oxyphénylamine, acide p. oxyphénylpropionique, acide p. oxyphénylacétique, acide p. oxybenzoïque, P. crésol, phénol et sur tous les composés correspondants à partir de la phénylalanine, jusqu'à l'acide benzoïque, qui sont exempts de l'oxhydryle phénolique. Il a également fait agir le ferment soluble sur l'alanine, l'éthyltyrosine, la chloracétyltyrosine, la glycytyrosine.

Il s'est servi dans toutes ces expériences de la tyrosinase extraite du son de froment, qui est exempte de laccase et dans une série d'expériences parallèles, il a utilisé la macération glycérinée de *Russula queletii* qui renferme, à côté de la tyrosinase, une forte proportion de laccase.

Je ne rapporterai que les expériences faites avec la tyrosinase du son de froment, expériences qui, de l'avis de M. G. Bertrand, sont les plus démonstratives, étant les plus simples.

L'auteur a utilisé une solution de tyrosinase à 2 pour 100. Les corps étudiés ont été mis en solution aqueuse à la dilution d'une molécule-gramme dans 100 litres d'eau. (1)

Dans chacune des expériences, 2 cm³ de la solution du corps à examiner étaient additionnés de 1/2 cm³ de solution de tyrosinase à 2 pour 100.

L'oxydation diastasique s'est manifestée par des colorations plus ou moins rapides et intenses.

De ses expériences, M. G. Bertrand tire une première conclusion: *Les seuls de tous les corps examinés qui soient oxydables par la tyrosinase renferment un oxydryle phénolique; c'est donc sur ce point de la molécule que doit porter vraisemblablement l'oxydation diastasique. La grandeur et la nature de la chaîne latérale semblent n'avoir dans la limite des cas observés qu'une influence secondaire, pourvu que cette chaîne ne soit pas trop fortement basique ou acide, elle n'empêche pas l'oxydation.*

(1) Pour éviter l'influence paralysante des fonctions basiques ou acides sur le ferment, on a employé les corps basiques à l'état de chlorhydrates et les corps acides à l'état de sels ammoniacaux.

Il en tire une seconde conclusion d'une portée beaucoup plus générale et qui modifie la conception courante du mode d'action des ferments. *Les résultats obtenus au cours des recherches que je viens d'exposer vont, une fois encore, à l'encontre du principe trop absolu de spécificité que l'on était en droit d'attacher, il y a quelques années et que l'on attache, encore assez généralement aujourd'hui, aux actions diastasiques. Loin d'être limitée à la tyrosine l'action de la tyrosinase s'étend, en effet, comme celle de la laccase ou comme l'action hydratante de la maltase, de l'émulsine et de la lipase à tout un groupe de composés définis. Le réactif diastatique, dont l'action paraissait d'une spécificité absolue quand on se bornait à l'étudier dans ses rapports avec le principe immédiat attaquant à côté duquel on l'avait découvert, n'a plus qu'une action spécifique relative quand on vient à reconnaître la fonction ou la structure chimique qui rendent le principe immédiat tributaire de son activité.*

M. G. Bertrand dégage la conséquence pratique que comporte ce fait: *Conformément à ces résultats, on ne devra plus pour identifier un chromogène avec la tyrosine se contenter de la double coloration en rouge orange, puis en noir, sous l'influence de l'air et de la diastase. La plupart des corps que j'ai examinés donnent la double coloration... Il faudra donc toujours tenter la séparation du chromogène à l'état pur, le caractériser par quelques-unes de ses constantes physiques et chimiques.*

Travaux de M. CHODAT (106).

M. CHODAT ayant étudié l'action de la tyrosinase sur des dérivés du benzène, aboutit à une conclusion analogue à

celle formulée par M. G. Bertrand: *Le ferment oxydant tyrosinase est actif vis-à-vis des dérivés du benzène possédant un oxhydrile fixé directement sur le noyau et une chaîne latérale, en position para par rapport à l'oxhydrile.*

3° INFLUENCE SUR LES ACIDES AMINÉS

Travaux de M. STAUB (107).

Ces travaux sont importants à connaître en ce qu'ils précisent les conditions de l'emploi de la tyrosinase comme réactif de la tyrosine.

M. Staub a constaté que l'action de la tyrosinase sur les acides aminés: glycocolle, alanine, leucine, phénylalanine ne s'accompagne de l'apparition d'aucun phénomène visible (production d'une coloration ou d'un précipité);

Que ces acides aminés n'ont pas une action empêchante sur l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase.

Il ressort donc des travaux de M. Staub que la tyrosinase peut être utilisée comme réactif de la tyrosine en présence d'acides aminés.

Travaux de M. CHODAT. — Hypothèses sur la formation de l'urée chez les animaux et des aldéhydes chez les végétaux.

M. CHODAT a constaté que la tyrosinase agit sur les acides aminés *en libérant de l'ammoniaque et de l'anhydride carbonique et en les ramenant à un aldéhyde (produit d'oxydation) qui contient un atome de carbone en moins.* Le glycocolle donne de l'aldéhyde formique, le phénylglycocolle de l'aldéhyde benzoïque. (108)

Ces résultats expérimentaux ont incliné l'auteur à penser que la formation des aldéhydes dans les végétaux pouvait s'accomplir par un mécanisme identique.

Dans l'espoir de donner une base plus solide à son hypothèse, M. Chodat a cherché si le pigment chlorophyllien jouait un rôle dans l'action de la tyrosinase sur les acides aminés. Il a constaté qu'« in vitro » ce pigment accélère fortement l'action de la tyrosinase sur le glyco-colle et le phénylglycocolle, tant à la lumière qu'à l'obscurité et il conclut :

Tout ce qui précède a un intérêt singulier pour le physiologiste et explique l'origine probable du benzaldéhyde à partir des matières protéiques et de leurs produits d'hydrolyse. Il est probable que la chlorophylle intervient dans cette réaction en raison de son action réductrice.

Etant donnée l'action de la tyrosinase sur les acides aminés, MM. CHODAT et SCHWEIZER (109) entrevoient la possibilité d'établir une théorie générale de la désamidation avec formation de CO^2 et NH^3 et d'un produit d'oxydation à un atome de C de moins. *Au point de vue de la physiologie animale, on aurait les éléments de la formation de l'urée. La désaminoxydase (tyrosinase) dégraderait les polypeptides et les acides aminés, non par un simple processus d'hydrolyse, mais par une oxydation dans le sens de la théorie de P. Hofmeister (110).*

4° INFLUENCE SUR LES POLYPEPTIDES A TYROSINE

M. CHODAT (95) a observé que la tyrosinase agit sur les polypeptides à tyrosine, en donnant des colorations variées, constantes et caractéristiques.

L'action de cette oxydase sur la tyrosine et les polypeptides à tyrosine en fait un réactif excellent pour suivre « pas à pas la protéolyse ».

L'emploi de la tyrosinase permet, avec certaines précautions, de *déceler au cours d'une peptolyse pepsique l'apparition des peptides à tyrosine. Plus tard, lorsque, par une éreptase, la tyrosine a été détachée, cette dernière sera reconnue par la teinte rouge, puis noir violacé ou bien violacée que prendra le liquide de peptolyse. Grâce à cette méthode, nous pouvons déceler la tyrosine dans les produits de peptolyse avant qu'elle ne soit détachée du polypeptide.*

5° INFLUENCE SUR LES POLYPEPTIDES EN PRÉSENCE DE P-CRÉSOL

M. CHODAT a constaté que *tous les polypeptides examinés : glycylglycine, glycyltyrosine, se sont comportés d'une manière analogue vis-à-vis du mélange tyrosinase-p. crésol. Au début, coloration violette qui passe au bleu, en général; coloration plus intense que ne le fait supposer les groupes NH² et COOH libres. Les groupes NH et C=O semblent avoir en présence des précédents une action additionnelle. Teinte et vitesse varient dans chaque cas. Les groupes CO et NH sont sans action sur le mélange p. crésol-tyrosinase, en l'absence des groupes NH² et COOH.*

6° INFLUENCE SUR L'INDOL EN PRÉSENCE DE P. CRÉSOL

Il y a formation, d'après M. Chodat, d'un pigment, in-

soluble dans l'eau, mais soluble dans l'éther et le chloroforme.

7° ANHYDRIDES CYCLIQUES DE LA TYROSINE

M. Staub (112) a constaté que la tyrosinase agissant sur les solutions de tyrosine anhydre et de glycylytyrosine anhydre donne *une coloration jaune abricot qui vire peu à peu au brun.*

8° INFLUENCE SUR LA PEPTONE DE WITTE, LA GÉLATINE, L'ALBUMINE

Cette action a été étudiée par M. STAUB qui conclut de ses recherches que le pouvoir oxydant de la tyrosinase doit être étendu à d'autres composés qu'à la tyrosine.

9° INFLUENCE SUR LES AMINES AROMATIQUES

BOURQUELOT (113) a constaté que la tyrosinase donne avec les amines aromatiques des colorations variées.

10° INFLUENCE SUR LES PHÉNOLS

Travaux de BOURQUELOT

Cet auteur a observé que tous les phénols et de nombreux dérivés éthérés des phénols sont oxydés par la tyrosinase.

Travaux de M. STAUB

M. STAUB a étudié l'action de la tyrosinase d'une part sur les crésols seuls; d'autre part, sur les crésols en pré-

sence d'acides aminés. Des résultats obtenus, il conclut : *La tyrosinase agit aussi bien sur les crésols que sur la tyrosine, en les transformant par l'intervention de l'oxygène en corps colorés en rouge. L'action a plus fortement lieu sur le crésol avec oxhydryle et chaîne latérale (groupe méthyl) en position para. Dans aucun cas, on n'obtient le produit noir du mélange tyrosine-tyrosinase.*

Les acides aminés ajoutés au mélange tyrosinase-crésol augmentent fortement l'intensité des réactions.

Travaux de M. CHODAT (95 et 114)

M. CHODAT a étudié l'action de la tyrosinase sur le p-crésol seul et sur le p-crésol en présence d'acides aminés divers. Il a observé que la tyrosinase purifiée et la tyrosinase impure se comportent de façon différente avec le p-crésol. Quelle que soit la concentration des liqueurs en tyrosinase et en p. crésol, cette oxydase purifiée donne avec le p. crésol une coloration jaune vif, puis jaune or, virant finalement au jaune orange, avec la tyrosinase impure, la coloration jaune passe rapidement au rouge cerise, coloration identique à celle que donne un acide aminé ajouté au mélange tyrosinase purifiée p. crésol, ce qui permettait de soupçonner la présence des acides aminés dans la tyrosinase impure et, en effet, M. Chodat a pu constater cette présence.

De ses nombreuses recherches sur l'action de la tyrosinase sur le p. crésol, en présence d'acides aminés, l'auteur conclut : *Tous les acides aminés étudiés, glycolle, leucine, tyrosine phénylalanine, phénylglycolle, se comportent de même en présence de la tyrosinase et*

du p. crésol; ils donnent une coloration rouge qui passe plus ou moins rapidement suivant les acides aminés à une coloration bleue qui est fortement dichroïque, sauf avec la tyrosine.

En présence de ces résultats, M. Chodat conclut que le mélange p. crésol-tyrosinase doit constituer un excellent réactif pour différencier les pepsinases des tryptases.

En effet, les produits de la dégradation des matières albuminoïdes par les pepsinases, pauvres en acides aminés, ne donnent, avec le mélange p. crésol-tyrosinase qu'une coloration rouge; ceux fournis par les tryptases, très riches en acides aminés, donnent, avec le même réactif, une coloration rouge, virant au bleu.

Le rôle identique, joué par tous les acides aminés en présence du mélange p. crésol-tyrosinase, pouvait laisser croire que ces acides agissaient comme catalyseurs. Il n'en est rien. M. Chodat a constaté que le glycocolle est consommé pendant la réaction. *Il prend part à la réaction déclanchée par le ferment, il entre en jeu dès le début et la fermentation est une fermentation du p. crésol et des acides aminés.*

11° INFLUENCE SUR LES MATIÈRES PROTÉIQUES ET LES PRODUITS CONNUS DE LEUR PEPTOLYSE EN PRÉSENCE DE PHÉNOLS

M. CHODAT a observé que les matières protéiques et les produits connus de leur peptolyse donnent, en présence de tyrosinase et de phénols (p. crésol, pyrocatéchine) toute une gamme « d'admirables colorations ». Les pigments

obtenus présenteraient la même composition et les mêmes caractères de solubilité que les pigments végétaux azotés (chlorophylle, rodophycine, phytocyanine).

L'auteur a montré que, dans l'action de la tyrosinase sur l'indol en présence d'un phénol, il y a production d'un pigment insoluble bleu qui rappelle certains dérivés de la chlorophylle (114).

12° INFLUENCE SUR LES SOLUTIONS DILUÉES DE TANIN ET D'ACIDE GALLIQUE

D'après M. CHODAT, la tyrosinase donnerait des pigments avec les solutions diluées d'acide gallique et de tanin; *selon les circonstances, on obtient toute la gamme des rouge-rose, des mauves et des bleu-vert*. Les propriétés de ces pigments sont identiques à celles des anthocyanes.

Réactifs de la tyrosinase

La TYROSINE fut considérée, pendant longtemps comme le réactif spécifique de la tyrosinase; elle n'est oxydée ni par les oxydases type laccase, ni par le système peroxydase-peroxyde d'hydrogène.

Depuis les travaux de MM. CHODAT et STAUB, consacrés à l'action de la tyrosinase sur les crésols, ces phénols sont envisagés comme des réactifs spécifiques de la tyrosinase. Elle fournit avec ces composés des réactions très différentes de celles données, dans les mêmes conditions expérimentales par le système peroxyde d'hydrogène-peroxydase. (115)

En effet :

Tyrosinase + p. crésol = coloration jaune clair, puis jaune d'or, enfin jaune brun.

— + m. crésol = coloration jaune d'or.

— + o. crésol = coloration rose rougeâtre.

Système peroxyde d'hydrogène-peroxydase + p. crésol = corps blanc, lourd, insoluble dans eau.

Système peroxyde d'hydrogène-peroxydase + m. crésol = corps rose clair.

Système peroxyde d'hydrogène-peroxydase + o. crésol = corps brun foncé.

La tyrosinase est sans action sur les réactifs généraux des oxydases type laccase.

De l'influence de divers agents sur la tyrosinase

1° INFLUENCE DE LA CHALEUR

MM. G. Bertrand et Rosenblatt (116) ont déterminé « la température mortelle » de diverses tyrosinases végétales. Leurs résultats expérimentaux sont particulièrement intéressants au point de vue de l'histoire générale des diastases. Ils ont constaté *qu'il existe chez les végétaux des variétés de tyrosinases dont la température mortelle est très différente.*

Pour leurs expériences, ils ont préparé avec chacun des échantillons d'un grand nombre de végétaux, deux liquides diastasiques, une macération glycinée et une solution aqueuse obtenue avec la diastase séparée par précipitation alcoolique.

Pour déterminer la température mortelle, ils ont utilisé la technique suivante : ils ont introduit 1 cm³ de ma-

cération glycinée ou de solution aqueuse de tyrosinase dans un tube à essais très étroit qu'on introduit dans un bain-marie réglé d'avance à température constante. A l'aide d'un thermomètre plongé dans le tube, on a suivi l'échauffement du liquide diastasique et à partir du moment où l'équilibre a été atteint, c'est-à-dire après deux à trois minutes, on a prolongé le chauffage exactement trois minutes. On a enlevé le tube de bain-marie et on y a ajouté 1 cmc. de solution de tyrosine à 1/1.000°. On a noté, comme température mortelle, celle qui rendait la diastase inactive, au point de ne plus donner de coloration avec la tyrosine, même après vingt-quatre heures de contact. Les températures mortelles ont été recherchées de 5 en 5 degrés.

Dans le tableau ci-joint, sont réunis quelques-uns des résultats obtenus par MM. G. Bertrand et Rosenblatt.

NOM DES ESPÈCES VÉGÉTALES	TEMPÉRATURES MORTELLES
Amanita rubescens	+ 60° à + 65°
Tricholoma grammopodium	+ 65° à + 70°
Russula queletii.....	+ 70° à + 75°
Pomme de terre (précipité).....	+ 75° à + 80°
Lentilles, pomme de terre (mac. glycinée)	+ 80° à + 85°
Betteraves (mac. glycinée)	+ 85° à + 90°
Son de froment (mac. glycinée ou précip.)	+ 90° à + 95°

D'après les deux auteurs, ces résultats peuvent s'expliquer :

soit par l'existence de tyrosinases de nature différente, offrant des résistances différentes à l'action de la chaleur;

soit par le rôle plus ou moins protecteur que peuvent exercer le dissolvant ou les substances qui, dans les végétaux, accompagnent la tyrosinase et sont entraînées en quantité variable suivant le procédé de préparation de la liqueur diastasique.

Ces deux auteurs ont effectué une série d'expériences pour établir l'influence du solvant et celle du mode de préparation.

Ils ont constaté que la température mortelle d'une tyrosinase obtenue par précipitation alcoolique ne diffère que de quelques degrés de celle de la même oxydase extraite par la glycérine et que les températures mortelles d'une même tyrosinase en solution aqueuse et en solution glycérolisée ne sont aussi éloignées que de quelques degrés.

De leurs expériences, MM. G. Bertrand et Rosenblatt concluent: *Donc les substances solubles ou précipitables par l'alcool qui accompagnent la tyrosinase ne sont pas la cause principale du phénomène examiné. Les différences tiendraient beaucoup plus à la nature, variable suivant l'origine, des substances diastasiques elles-mêmes.*

Les tyrosinases mycologiques sont les plus fragiles, les tyrosinases des végétaux supérieurs sont les plus stables.

La présence des substances qui accompagnent les catalyseurs oxydasiques dans les milieux naturels ne suffit pas à expliquer les écarts observés entre les températures mortelles. Ceux-ci doivent être dus surtout à la nature un peu différente, dans chaque cas, de la tyrosinase elle-même.

Des résultats expérimentaux obtenus, les auteurs dé-

duisent qu'il y a nécessité, lorsqu'on veut utiliser la température mortelle pour caractériser une diastase ou la séparer d'autres substances analogues, de ne point admettre, *a priori*, comme exacte, la température mortelle déterminée dans une préparation ayant une origine différente.

A cette observation, on peut en ajouter une autre : l'énoncé de la température mortelle d'une tyrosinase n'a aucune signification, si l'on n'indique pas en même temps l'origine de la tyrosinase et le substratum en fonction duquel cette température a été déterminée.

On doit, en effet, à M. Staub, une notion nouvelle : la température mortelle d'une même tyrosinase varie avec le substratum en fonction duquel on étudie cette température mortelle. La température mortelle de la tyrosinase du *Solanum tuberosum* est de $+ 70^{\circ}$ à $+ 72^{\circ}$ vis-à-vis de la tyrosine, et de $+ 85^{\circ}$ vis-à-vis du réactif p. crésol-acide aminé. M. Staub explique ce fait par la différence des concentrations des solutions de tyrosine et du réactif p. crésol-acide aminé, et aussi par la différence de sensibilité de ces réactifs à l'action de la tyrosinase.

2° INFLUENCE DU TEMPS

La tyrosinase offre au temps une résistance qui semble intermédiaire entre celle de la laccase et celle de la peroxydase.

M. CHODAT (95) cite le cas d'une tyrosinase de *Solanum tuberosum* ayant gardé toute son activité après trois ans et celui d'une tyrosinase de *Russula delica* inaltérée après huit ans.

L'auteur estime que les tyrosinases doivent être moins sensibles aux modifications amenées par le temps que les oxydases type laccase. Il trouve une preuve de cette affirmation dans le fait qu'une préparation diastasique de *Lactarius vellereus*, âgée de huit ans, avait perdu sa fonction laccase et avait conservé intacte sa fonction tyrosinase.

La résistance de la tyrosinase paraît inférieure à celle de la peroxydiastase, puisque M. Linossier (117) cite le cas, très remarquable, d'une peroxydiastase de pus qui, après dix-huit ans de conservation, a gardé toute son activité.

3° INFLUENCE DE LA LUMIÈRE

M. AGULHON a constaté que la tyrosinase en solution se comporte comme la laccase en solution vis-à-vis de la lumière visible et de la lumière ultra-violette.

4° INFLUENCE DE L'EAU OXYGÉNÉE

L'action de l'eau oxygénée dépend de « l'âge » de la tyrosinase et de la quantité de réactif utilisé.

M. BACH a constaté que l'eau oxygénée produit une accélération très marquée de l'action de la tyrosinase altérée, affaiblie par le temps dans son pouvoir oxydant. Il estime que le réactif intervient en détruisant des substances réductrices qui se forment à la longue dans cette oxydase, et s'opposent à son action ou masquent cette action.

Il a observé qu'à dose faible, l'eau oxygénée n'a au-

cune influence accélératrice et qu'à dose élevée, elle a une action retardante manifeste sur l'oxydation de la tyrosine.

M. STAUB a établi qu'à forte concentration, l'eau oxygénée ralentit ou supprime l'action de la tyrosinase sur la tyrosine et sur le mélange p-crésol et glycocolle.

5°. INFLUENCE DES ACIDES ET DE L'ANHYDRIDE CARBONIQUE

M. BERTRAND a signalé que les résultats qu'il a obtenus dans son étude de l'influence des acides sur la laccase, sont applicables à la tyrosinase.

M. AGULHON (119) a constaté que, même à la dose de 30 grammes par litre, l'*acide borique* est sans action sur le phénomène d'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase, mais qu'il agit sur le phénomène de coagulation des produits obtenus. *L'acide borique s'est montré favorable à la coagulation des mélanines dans l'action de la tyrosinase sur la tyrosine. L'influence exercée par l'acide borique porte sur le phénomène annexe de coagulation des produits formés et agit comme adjuvant des sels de calcium. Son action est probablement physique et il faut la rapprocher du phénomène d'adhésion moléculaire par lequel Duclaux explique le phénomène de coagulation.*

D'après M. CHODAT, l'*anhydride carbonique* a une influence inhibitrice remarquable sur le mélange tyrosinase p. crésol-glycocolle. Cette action porte sur l'oxydase seulement, et il ne s'agit pas d'une altération du ferment, car on peut, par une simple agitation prolongée, dissocier cette combinaison (adsorption) et ramener plus ou moins la tyrosinase à l'état normal.

6° INFLUENCE DES PHOSPHATES ALCALINS BIBASIQUES

De son étude de l'action des phosphates alcalins bibasiques sur l'oxydation de la tyrosine par la tyrosinase, M. J. WOLFF (120) conclut à l'influence nettement favorisante de ces sels à faibles doses.

L'auteur signale que le phosphate disodique retarde la réaction au début, et qu'il la favorise beaucoup dans la suite.

M. J. Wolff a constaté qu'en présence de glycérine, l'addition de phosphate disodique ne provoque plus de retard, bien que la glycérine n'apporte aucun changement dans la réaction du milieu.

Système chimique à pouvoir oxydant analogue à celui de la tyrosinase

MM. J. WOLFF et DE STÖCKLIN ont réalisé un système chimique: tannate de fer, eau oxygénée, qui oxyde la tyrosine.

Synthèse de la tyrosinase à l'aide des oxydases type laccase et du système peroxydiastase-eau oxygénée.

MM. CHODAT et FREDERICKS (121) ont constaté, fortuitement, que le suc de *Vicia Faba*, additionné d'eau oxygénée, se comporte, comme la tyrosinase vis-à-vis de la tyrosine. Ils ont reconnu ensuite que le suc de *Deliciosa monstera* possède la même propriété. Ces ob-

servations leur firent supposer qu'il serait peut-être possible de donner la fonction tyrosinase à des ferments solubles oxydants, par addition de suc bouilli de *Vicia Faba* et de *Deliciosa monstera*. L'expérimentation confirma leur hypothèse.

Ils ont conféré une fonction tyrosinase à une oxydase type laccase (privée de toute trace de tyrosinase par chauffage à 65°), par addition de suc bouilli de *Vicia Faba*, ou de *Deliciosa monstera*.

Ils ont conféré une *fonction tyrosinase* au système peroxydiastase du raifort-eau oxygénée, par addition des mêmes sucs bouillis.

Ces sucs bouillis jouent donc le rôle de co-ferments. Des expériences de ces auteurs, il ressort que :

Oxydase, type laccase + co-ferment = *tyrosinase*.
Système peroxydiastase-eau oxyg. + co-ferment = *tyrosinase*.

D'après les expériences de MM. Chodat et Freedericks, la tyrosinase se révèle comme une « propriété » susceptible d'être conférée à des ferments solubles oxydants par addition d'un co-enzyme convenable.

Les résultats obtenus par ces auteurs permettent de penser que le problème futur consistera à trouver des co-ferments, à l'aide desquels on pourra aiguiller une réaction dans une direction déterminée.

Et un jour, il sera peut-être établi que le calcium confère un pouvoir coagulant à une diastase à laquelle d'autres co-enzymes conféreront d'autres pouvoirs (pepsique, amylolytique, etc.).

Sérum antioxydasique polyvalent

M. GESSARD (122) a préparé un sérum anti-oxydasique polyvalent, en injectant sous la peau d'un lapin, des macérations glycerinées de *Russula delica*. Ce champignon contient de la tyrosinase, de la peroxydiastase et une oxydase type laccase.

Le sérum obtenu est *préventif* et *curatif*.

Il prévient :

Le roussissement de la tyrosine par la tyrosinase du *Russula*, il est donc *antityrosinase*,

Le bleuissement de l'émulsion récente de résine de gayac par l'oxydase type laccase du *Russula*, il est donc *antilaccase*,

le bleuissement de l'émulsion de résine de gayac peroxydée par la peroxydiastase du *Russula*, il est donc *antiperoxydiastase*.

Il arrête :

l'action de la tyrosinase sur la tyrosine; l'intensité de la coloration du mélange tyrosine-tyrosinase n'augmente plus après addition de quantités suffisantes de sérum.

Cette double action, préventive et curative, est spécifique. Elle concerne seulement les diastases de l'espèce végétale utilisée dans la préparation du sérum. La tyrosinase de la seiche, la peroxydiastase du malt ne sont pas influencées par le sérum de *Russula*.

Rôle de la Tyrosinase

1°. RÔLE CHIMIQUE

La tyrosinase est l'un des réactifs les plus sensibles de la tyrosine ; ce n'est pas un réactif spécifique, de nom-

breux composés voisins de la tyrosine se colorant en rouge sous son action.

Elle est utilisée dans l'étude des ferments protéolytiques (Harlay) (111) ; pure ou en présence de p. crésol, elle permet de suivre *pas à pas la peptolyse*.

2° RÔLE PHYSIOLOGIQUE

Des hypothèses nombreuses ont été émises sur le rôle physiologique de la tyrosinase.

Elle semble jouer un rôle essentiel dans la formation des PIGMENTS NOIRS dans les organismes animaux et végétaux. Son rôle a été établi d'une manière indiscutable dans la production de l'encre de seiche (123), dans celle des tumeurs mélaniques chez le cheval (124) et dans la coloration du pain bis (125). Dans la plupart des cas étudiés, c'est la tyrosine qui par oxydation incomplète donne naissance aux produits mélaniques. Dans quelques cas, la substance chromogène n'a pas été identifiée.

MM. Chodat et Schryver estiment qu'en raison de sa fonction désaminoxydase, la tyrosinase intervient dans la formation de l'URÉE ANIMALE.

De l'action de la tyrosinase sur les matières protéiques, en présence de phénols et de ce que peptides, phénols, indols, sont des produits du métabolisme végétal, M. CHODAT conclut qu'on est fondé à admettre que la tyrosinase remplit un rôle dans la PRODUCTION DES PIGMENTS VÉGÉTAUX AZOTÉS.

En raison de son action sur les solutions diluées de tanin et d'acide gallique, l'auteur estime que cette dias-

tase doit aussi remplir un rôle dans la FORMATION DES PIGMENTS VÉGÉTAUX NON AZOTÉS.

M. Chodat ne considère pas comme résolu le problème de la genèse des pigments dans les végétaux. La tyrosinase ne serait pas la seule diastase à intervenir dans ce phénomène; à son avis, des associations de ferments solubles, oxydants ou non, joueraient aussi un rôle dans la production des composés.

Schinoxydase

Elle a été extraite par M. Sarthou (37) du faux poivrier — *Schinus molle* — de la famille des térébinthacées.

L'étude de sa composition chimique a été particulièrement instructive au point de vue de la connaissance des oxydases en général. M. Sarthou a décelé dans la schinoxydase la présence du fer en quantités importantes, et l'absence du manganèse. Ce résultat établissait donc que le manganèse n'est pas le seul élément minéral constitutif des oxydases.

Le fer y existe à l'état de composé organique et, d'après l'auteur: *Le pouvoir oxydant de la schinoxydase dépend plus de la constitution de la partie organique que de la proportion de fer.* Cette conception de M. Sarthou diffère de celle de la plupart des auteurs qui reconnaissent à la partie métallique de l'oxydase le rôle prépondérant dans le pouvoir oxydasique.

Ferments solubles des champignons ou ferment soluble oxydant des champignons

Ces deux appellations désignent l'ensemble des oxy-

dases qui existent dans certains champignons. On connaît, depuis longtemps, deux oxydases faisant partie de cet ensemble : la tyrosinase et une oxydase type lac-case. M. G. Bertrand a montré que ces deux oxydases coexistent toujours dans les champignons à ferments oxydants. Il y a quelques années, M. J. Wolff (127) a signalé dans le suc de *Russula delica* l'existence d'une troisième oxydase. Il y a donc tout lieu de penser qu'on ne connaît pas encore toutes les oxydases qui constituent le « ferment oxydant » des champignons.

MM. BERTRAND et BOURQUELOT ont constaté que les ferments oxydants sont très répandus chez les champignons. A l'aide de la teinture de résine de gayac récente, ils ont décelé leur présence dans 62 espèces sur 109 étudiées. Les 19 espèces du genre *Russula* examinées par les auteurs en contiennent.

La répartition du ferment oxydant dans le champignon est irrégulière, certaines portions du champignon peuvent en être totalement dépourvues.

Le ferment oxydant apparaît parfois au cours du développement du champignon : jeune, une espèce peut n'en pas contenir, alors qu'à une période plus avancée de sa vie, elle en renfermera.

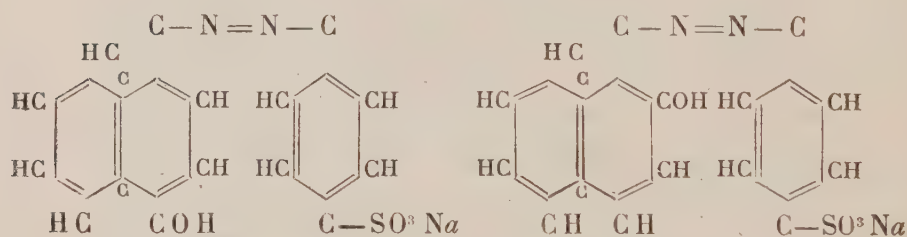
MM. BERTRAND et BOURQUELOT ont signalé que le ferment oxydant des champignons est peu sensible à l'action de la *chaleur*, ses propriétés oxydantes ne disparaissent qu'après une ébullition de quelques minutes.

M. HÉRISSEY (128) a constaté qu'en l'absence d'air incessamment renouvelé, le ferment oxydant des champignons offre, au *vieillissement*, une résistance variable avec son origine.

Dans les essais effectués par l'auteur, le ferment oxydant du *Russula delica* s'est montré actif après vingt ans, alors que celui du *Russula queletii* avait perdu toute activité après deux ans de conservation.

M. J. WOLFF (127) a constaté que, vis-à-vis de la tyrosine et d'autres réactifs des oxydases découverts par lui, des extraits glycéринés de *Russula delica* ont leur maximum d'activité pour une réaction voisine de la neutralité à la phthaléine du phénol et que le phosphate disodique a une action favorisante, à faible dose, sur l'oxydation des corps précédents par les extraits glycéринés.

L'auteur signale qu'un exemple nouveau du rôle que peut jouer chez des corps isomères la position relative des groupements latéraux dans le noyau benzénique (au point de vue de leur attaque par les diastases), nous est fourni par les orangés I et II.



Orangé I = a Naphtolazobenzène,
sulfonate de sodium.

Orangé II = b Naphtolazobenzène,
sulfonate de sodium.

En effet, l'orangé I est attaqué, avec énergie, par l'oxydase de l'extrait de *Russula* et l'orangé II est insensible à cette influence.

BOURQUELOT a observé que la *vanilline*, sous l'influence du ferment oxydant des champignons, est susceptible de fournir, avec rapidité, un précipité blanc grisâtre,

presque entièrement cristallisé et qui se dépose au sein du liquide fermentaire.

M. LERAT (129) a étudié ce composé en utilisant comme sources d'oxydases les produits de la macération dans l'eau chloroformée du *Russula delicata* et du *Russula foetens*. Il a déterminé les caractères de solubilité et la température de fusion du corps obtenu et il a pu établir que ce composé présente toutes les propriétés du produit caractérisé par Tiemann comme étant de la *déhydrodivanilline* et que cet auteur a préparé par action du perchlorure de fer sur la vanilline.

M. Lerat a, lui aussi, obtenu, au moyen du perchlorure de fer et de la vanilline de la *déhydrodivanilline* et il a constaté que ce corps présente toutes les propriétés de la *déhydrodivanilline* fournie par la diastase oxydante des champignons.

Les travaux de M. Lerat apportent l'un des premiers exemples d'une réaction effectuée par un agent chimique et par un agent diastasique, suivant un même mécanisme et aboutissant, dans l'un et l'autre cas, à la production d'un même composé.

MM. H. COUSIN et H. HÉRISSEY ont signalé qu'une solution aqueuse de *thymol*, soumise à l'action du ferment oxydant des champignons, donne rapidement en présence de l'air, un trouble blanchâtre qui se résout en un précipité: (77)

Les auteurs ont établi que le produit obtenu dans ces conditions n'est pas un principe immédiat défini. Ils en ont séparé un corps cristallisé qu'ils ont identifié avec le *dithymol* obtenu par voie chimique avec les sels ferriques, et qui provient de la condensation de deux molécules de

thymol. Ils ont observé que dans cette oxydation diastasi-que, il se forme d'autres produits de nature quinonique provenant de la condensation de plus de deux molécules de phénol.

MM. Cousin et Hérissé ont constaté que les produits d'oxydation sont dépourvus de pouvoir antiseptique; ils en concluent que le thymol est impropre à conserver, à l'abri des microorganismes, des milieux renfermant des ferments oxydants.

M. J. BOUGAULT (130) a étudié la constitution du précipité qui se forme dans l'oxydation de la *morphine* par le suc de *Russula delica*.

Dans ses recherches, l'auteur a employé le chlorhydrate de morphine, plus soluble dans l'eau que la morphine.

Il a identifié la base du sel formé avec l'*oxymorphine* qui se produit dans l'oxydation de la morphine par le ferri-cyanure de fer alcalin.

En présence des résultats obtenus, M. Bougault suppose que, sous l'influence des oxydations dont l'organisme est le siège, la morphine, absorbée par la voie stomacale, doit se transformer en oxymorphine.

Oxydases de la gomme arabique

Les oxydases ou l'oxydase de la gomme arabique n'ont pas été isolées.

Pour étudier leurs propriétés, on utilise une solution aqueuse à dix pour cent de gomme arabique.

BOURQUELOT (131) a montré que ce produit altère, en les oxydant, un grand nombre de corps :

des composés chimiques à fonctions variées : phénols, amines, alcaloïdes, glucosides, etc. ;

des médicaments galéniques divers : extraits, préparations galéniques opiacées liquides, etc. ;

des matières colorantes extraites de fleurs nombreuses.

M. LERAT (129), a oxydé la vanilline à l'aide du ferment oxydant de la gomme arabique. Il a obtenu de la déhydrodivanilline.

En 1902, M. TANZI (132), a observé qu'une solution de gomme arabique, ajoutée à une solution aqueuse de pyramidon, donne un mélange coloré en bleu violet, qui passe au violet franc, puis au rose et au jaune. Le camphorate de pyramidon fournit la même réaction.

Les travaux de MM. Bourquelot, Lerat et Tanzi ont établi que la présence d'une oxydase dans la gomme arabique crée à ce produit de nombreuses incompatibilités.

Œnoxydase

C'est l'oxydase qui provoque la casse des vins. Son nom lui a été donné par M. CAZENEUVE (133).

M. GOUIRAND (134) a attribué la casse à une diastase, sans dire si elle était oxydante.

L'œnoxydase a été isolée par M. Cazeneuve qui l'a étudiée et a constaté qu'elle possède les propriétés fondamentales de la laccase.

Maloxdases

Ce sont les oxydases des pommes et des poires.

M. LINDET (135) a signalé que le tanin de la pomme à cidre s'oxyde quand le fruit est déchiré ou broyé. Il a

établi la nature diastasique de cette oxydation qu'il attribue à une oxydase type laccase.

Spermase

La spermase est l'oxydase de l'embryon d'orge. Elle a été découverte et étudiée par GRUSS (136).

Oxydases des végétaux supérieurs

On a signalé l'existence d'oxydases dans un très grand nombre de végétaux supérieurs: Digitale, Aconit, Belladone, Hellébore fétide, Gui, Cola, etc.

Toutes ces oxydases paraissent appartenir au type laccase.

Oxydases des bactéries

M. Roger a constaté que, si on cultive le *bacterium coli* sur fond d'artichaut, on obtient une coloration verte caractéristique. Cette observation fut utilisée par M. G. Roux pour différencier le *bactérium coli* du bacille d'Eberth, qui ne fournit pas de pigment vert dans les mêmes conditions expérimentales.

M. Roux (137) attribue la production du pigment à l'action d'une oxydase sécrétée par le *bacterium coli*, et il appuie son opinion sur le fait que la laccase colore également en vert le fond d'artichaut.

Oxydases des levures

M. Tolomei (138) a constaté la présence d'oxydases dans trois levures: *Saccharomyces cerevisiæ*, *S. ellipsoïdus*, *S. apiculatus*.

Il s'est servi de teinture récente de résine de gayac pour constater la présence de l'oxydase de la première levure; il a déduit l'existence des deux autres, du volume d'oxygène absorbé, et de la quantité d'anhydride carbonique dégagé, dans des conditions expérimentales déterminées.

L'auteur attribue à ces oxydases le pouvoir de contribuer à la production du bouquet des vins. Il démontre que le bouquet du vin muscat est dû à l'oxydase du *Saccharomyces ellipsoïdus*, puisqu'en ensemençant du vin blanc ordinaire avec cette levure, on lui communique le bouquet du vin muscat, après exposition à l'air.

M. Effront, par des voies différentes, arrive aux mêmes conclusions que M. Tolomei sur l'existence d'oxydases dans les levures.

Il a observé que la levure desséchée, mise en tas, après division en petits fragments, subit une élévation de température qui peut atteindre 40°, par exposition à l'air, alors qu'il n'y a pas d'élévation de température dans le vide.

L'auteur a, en outre, établi un fait important: l'oxydase peut être extraite de la levure et entraînée par l'eau, à la façon de la zymase de Buchner. A cet effet, on broie la levure avec de la pierre ponce et on met macérer, dans l'eau froide, la pâte obtenue. Le liquide, séparé de la bouillie par filtration, possède les caractères des oxydases.

II. Oxydases animales

On a signalé l'existence d'un grand nombre d'oxydases animales. Des recherches plus minutieuses ont révélé que plusieurs d'entre elles n'étaient pas des oxydases, mais des peroxydiastases ou des diastases oxydo-réductrices.

Aussi n'étudierai-je que les oxydases animales dont l'existence est incontestée et je résumerai l'histoire de la salicylase qui, après avoir été pendant longtemps la seule oxydase animale connue, est considérée, à l'heure actuelle, comme une diastase oxydo-réductrice.

Recherche et identification des oxydases animales

La plupart des oxydases animales ont été étudiées *in situ*, c'est-à-dire dans un milieu très complexe dont les constituants nombreux sont susceptibles d'intervenir dans la réaction oxydasique. Il serait donc souhaitable qu'on substituât, pour les oxydases animales, à cette appellation d'oxydase, celle de « système oxydasique » qui éveille dans l'esprit une idée de complexité plus conforme, semble-t-il, à la réalité des faits.

On recherche les oxydases animales au moyen de la teinture récente de résine de gayac, ou à l'aide de l'émulsion de cette résine. La recherche doit être effectuée sitôt après la mort, car il y a formation très rapide d'eau oxygénée dans les tissus.

La présence d'une oxydase animale ayant été décelée,

on identifie cette oxydase, c'est-à-dire qu'on détermine le corps sur lequel elle agit.

A cet effet, on opère généralement de la façon suivante: on divise le suc ou le tissu broyé en plusieurs portions, chacune d'elles est mélangée à un substratum d'oxydation: alcool, aldéhyde, acide, etc.; on laisse en contact, dans des conditions expérimentales précises de temps, de température et d'aseptie (le microbe est le grand ennemi de ces recherches, il peut provoquer des réactions qui faussent le résultat obtenu); le temps fixé écoulé, on déduit l'oxydation du volume d'oxygène absorbé ou de la production d'un composé d'oxydation.

OXYDASE DU LEUCOCYTE

M. P. PORTIER (24) a observé qu'il existe, chez les *vertébrés et dans les différents groupes de la série animale, des ferments oxydants, que ces ferments ont les mêmes propriétés générales que les mêmes agents chimiques isolés chez les végétaux et qu'ils s'en distinguent cependant par une moins grande puissance d'action.*

Des expériences minutieuses lui ont permis d'établir que ces oxydases n'existent ni dans le sang circulant, ni dans les tissus de l'animal vivant.

Les essais de M. P. Portier semblent prouver que l'oxydase est mise en liberté par le leucocyte au moment de sa destruction et que *la destruction des leucocytes est la seule et unique origine des oxydases des animaux.*

L'auteur a émis sur le rôle des oxydases animales des vues ingénieuses, que j'exposerai dans la suite.

LUCIFÉrase

M. R. DUBOIS (139) a établi que la fixation d'oxygène est nécessaire à la production de la lumière chez les animaux et les végétaux et que cette fixation se fait par l'intermédiaire d'une substance possédant tous les caractères des diastases et qu'il a, pour cette raison, nommée « Luciférase ».

M. R. Dubois a constaté que les organes lumineux des lampyres et les œufs contenus dans les ovaires de la femelle donnent, avec la teinture de gayac, une belle coloration bleue.

ALCOOLASE OU ALCOOLOXYDASE OU HÉPATOALCOOLASE

M. BATTELLI et M^{lle} STERN (140) ont donné le nom d'alcoolase à l'oxydase animale qui a la propriété d'oxyder l'alcool éthylique, avec production d'acide acétique et absorption d'oxygène.

Localisation. — Le foie seul en contient des quantités importantes; les autres tissus en paraissent dépourvus ou n'en renferment que des quantités insignifiantes. Les foies les plus riches sont ceux de cheval, de bœuf et de mouton.

Recherche. — Plusieurs procédés sont utilisés pour déceler la présence de l'alcooloxydase dans les organes. Le plus simple consiste à mesurer, quelques heures après la mort, les volumes d'oxygène absorbés par le tissu, en présence et en l'absence d'alcool éthylique, toutes choses égales d'ailleurs. Si le volume d'oxygène absorbé, en présence d'alcool, est supérieur, le tissu contient de l'alcooloxydase.

On peut encore déduire la présence de l'alcooloxydase soit de la disparition de l'alcool, soit de la production d'acides volatils. Ces procédés de recherche sont d'exécution fort délicate, la masse d'alcool disparue et celle d'acides produits sont très faibles. Cent grammes de foie de cheval n'oxydent, en une heure, que 15 ou 20 cg. d'alcool éthylique.

Préparation. — L'alcooloxydase est extraite par l'acétone; le liquide d'épuisement, filtré, est évaporé dans le vide en présence d'acide sulfurique.

Propriétés. — On obtient ainsi une poudre blanche, soluble dans l'eau. Ses propriétés oxydantes diminuent rapidement et l'ébullition les lui fait perdre.

L'alcooloxydase oxyde encore les alcools méthylique, propylique, isobutylique; *toutefois l'oxydation subie par ces alcools est beaucoup moins énergique que celle subie dans les mêmes conditions par l'alcool éthylique.*

Les auteurs ont constaté que, *dans l'oxydation de l'alcool éthylique par cette oxydase, il y a production d'aldéhyde acétique, en même temps que formation d'acide et que les quantités d'aldéhyde fournies variaient avec les conditions de l'expérience.*

D'autre part, M. Battelli et M^{11e} Stern ont observé qu'au contact de l'air, l'aldéhyde acétique, mis directement au contact des tissus riches en alcoolase, est oxydée avec production d'acide acétique.

En présence de ces deux faits: formation de quantités, variables suivant les conditions expérimentales d'aldéhyde acétique par action de l'alcoolase sur l'alcool éthylique, oxydation par le foie de l'aldéhyde acétique, avec production d'acide, les auteurs ont supposé que

l'oxydation fermentative de l'alcool éthylique par le foie pouvait être due non pas à une, mais à deux oxydases.

D'après M. BACH, l'alcooloxydase ne serait pas une diastase unique, mais un mélange de deux agents dont l'un fait subir à l'alcool une transformation qui permettra son oxydation par l'autre. L'auteur n'a pas isolé ces deux agents.

Ainsi, l'existence de l'alcoolase, dont l'individualité semblait si solidement établie, est mise en doute. S'agit-il d'une diastase unique ou d'un mélange de deux diastases?

URICOXYDASE OU URICASE

C'est l'oxydase animale qui transforme l'acide urique en allantôine.

Il ne faut pas confondre l'uricoxydase avec « le ferment uricolytique ». On a compris, jusqu'ici, sous ce nom, les différents processus qui pouvaient intervenir dans la transformation de l'acide urique. Nous rencontrons ici un exemple du caractère fantaisiste de la nomenclature souvent appliquée en chimie biologique.

La présence de l'uricoxydase a été constatée dans différents tissus animaux, les plus riches sont le rein du cheval et celui du bœuf. *Les tissus de l'homme ne renferment pas d'uricoxydase*; ce fait a été observé par BATTELLI et STERN et par WIECHOWSKY. Cet auteur a constaté que, de l'urine de tous les mammifères, seule celle de l'homme ne contient pas d'allantôine. Il a encore signalé l'absence d'uricoxydase dans les tissus du canard.

Plusieurs procédés sont utilisés pour apprécier la teneur d'un tissu en uricoxydase.

L'un des plus employés consiste à déduire cette teneur de la masse d'acide urique détruite par le tissu. Ce procédé comporte deux importantes causes d'erreur :

1° Les tissus animaux peuvent détruire l'acide urique par différents procédés, par l'hydrolyse en particulier. Croftan a constaté que, bien que dépourvus d'uricoxydase, le foie et le rein de l'homme possèdent, à un assez haut degré, le pouvoir de détruire l'acide urique. On ne peut donc, avec certitude, attribuer à l'action de l'uricoxydase, tout l'acide urique transformé.

2° *Certains tissus produisent de nouvelles quantités d'acide urique*; donc, dans quelques expériences, les résultats observés pourront être inférieurs aux résultats exacts.

M. Battelli et M¹¹⁰ Stern dosent la quantité d'uricoxydase contenue dans les différents tissus d'après l'augmentation des échanges gazeux produits par l'addition d'acide urique. Dans leurs expériences, il se servent, non pas du tissu lui-même, mais du précipité obtenu en traitant l'organe par l'alcool et l'éther. *L'uricoxydase ne paraît pas être diminuée par la précipitation alcoolique*. De l'avis des auteurs, ce mode opératoire permet d'éviter l'action d'une ou plusieurs substances présentes dans les tissus et qui diminuent ou suppriment l'action de l'uricoxydase. La présence de ces substances impose l'obligation d'accompagner le dosage de l'uricoxydase dans un organe frais, du dosage dans le précipité alcoolique de cet organe.

D'après Battelli et Stern (141), l'uricoxydase produit une absorption d'oxygène et un dégagement d'anhydride carbonique.

A propos du dégagement d'anhydride carbonique qui

accompagne la destruction de l'acide urique par l'uricoxydase, MM. BATTELLI et BACH (142) ont écrit: *L'anhydride carbonique est toujours éliminé par dédoublement, jamais par oxydation directe. Dans l'oxydation, l'oxygène se porte sur l'hydrogène, jamais sur le carbone. Les enzymes qui produisent l'hydrolyse sont un moyen pour obtenir des substances facilement oxydables.* Puisque la destruction de l'acide urique s'accompagne d'une absorption d'oxygène, et d'un dégagement d'anhydride carbonique, il faut donc admettre, si l'opinion de Battelli et Bach est exacte, que dans cette destruction interviennent l'uricoxydase et une diastase hydrolysante.

M. Battelli et M^{lle} Stern estiment que l'uricoxydase joue un rôle dans la respiration fermentative puisque cette respiration serait due à des ferments oxydants pouvant produire de l'anhydride carbonique.

ALDÉHYDASE OU SALICYLASE

En 1876, SCHMIEDEBERG (149) établit qu'au contact du sang artérialisé circulant dans les organes, l'aldéhyde salicylique est transformé en acide salicylique. Il détermine les conditions de formation de l'acide et il conclut à la nature diastasique de l'oxydation. A son avis, l'agent de l'oxydation est un ferment oxydant direct.

Cette oxydase reçut dans la suite les noms de Salicylase, d'Aldéhydase.

MM. JACQUET, SALKOWSKY, ABELOUS et BIARNÈS confirmèrent les résultats expérimentaux obtenus par Schmiedeberg.

Dès 1896, M. G. BERTRAND (143) émet des doutes sur l'existence de cette oxydase: *Les quantités de substances oxydées dans ces expériences ont été si minimes, même dans les meilleures conditions, qu'elles ne permettent pas de trancher définitivement entre l'hypothèse de la réduction d'un simple corps oxydé préexistant en quantités finies et très faibles dans les liquides en expérience, ou celle d'une véritable intervention diastasique.*

Recherches de Medwedew, d'Abelous et Aloy

MEDWEDEW (144), ABELOUS et ALOY (145) constatèrent, avec étonnement, que, toutes choses égales d'ailleurs, la

masse d'acide salicylique formée, dans l'action des tissus animaux sur l'aldéhyde correspondante, est plus grande, en l'absence, qu'en présence d'oxygène.

Ces auteurs admirent alors que l'oxygène nécessaire à l'oxydation de l'aldéhyde salicylique était fourni par des substances oxygénées contenues dans les organes ou les tissus.

MM. Abelous et Aloy se sont demandés si la diastase animale qui réduit les nitrates en nitrites et celle qui oxyde l'aldéhyde salicylique pour donner l'acide correspondant ne sont pas, *en réalité, un seul et même ferment à la fois oxydant et réducteur.*

Pour vérifier leur hypothèse, il ont effectué deux séries de recherches :

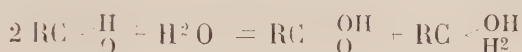
1° Détermination de l'influence de divers facteurs sur l'oxydation de l'aldéhyde et la réduction des nitrates (température, oxygène, sulfhydrate d'ammonium, sulfo-cyanate d'ammonium, nicotine). Ils ont constaté que toutes les influences paralysantes ou activantes de l'oxydation paralysaient ou activaient la réduction.

2° Détermination de la hiérarchie des organes d'après leur teneur en diastase oxydante et d'après leur teneur en diastase réductrice. Les organes qui fournissent les extraits les plus oxydants fournissent également les plus réducteurs.

De l'ensemble de ces faits, les auteurs se croient autorisés à conclure à l'identité de la diastase oxydante et de la diastase réductrice. *En réalité, il existerait dans l'organisme, un ferment oxydo-réducteur.*

Objection de BACH.

M. BACH, frappé par la particularité signalée par MM. Medwedew, Abelous et Aloy, particularité incompatible avec la propriété fondamentale des oxydases, pense que *la salicylase n'est pas une oxydase, mais un catalyseur accélérant l'oxydation hydrolytique de l'aldéhyde salicylique, c'est-à-dire la réaction de Canizzaro:*



Si mon hypothèse est exacte, ajoute-t-il, on doit trouver dans les tissus, à côté de l'acide, produit d'oxydation, l'alcool, produit d'hydrogénation de l'aldéhyde.

Des expériences réalisées par M. BATTELLI et M^{11e} STERN (146) semblent prouver l'exactitude de l'hypothèse de M. Bach. Ces auteurs ont constaté la production d'acide salicylique et de saligénine dans l'action des tissus animaux sur l'aldéhyde salicylique.

De cette observation, ils concluent que la transformation de l'aldéhyde salicylique en acide par les tissus animaux est due, non pas à une oxydase, mais à un ferment dédoublant. *L'aldéhydase doit donc être rayée des ferments oxydants; elle est tout à fait différente de l'alcooxydase qui oxyde les alcools gras et aromatiques en présence d'oxygène.* Récemment (64), M. Battelli et M^{11e} Stern ont, de nouveau, exprimé leur opinion sur l'aldéhydase: *L'aldéhydase n'est pas un vrai ferment oxydant, c'est un ferment qui dédouble l'aldéhyde en alcool et acide sans intervention d'oxygène moléculaire.*

M. DONY-HÉNAULT et M^{11e} VAN DUUREN (80) ont fait

une étude méthodique de l'action des tissus animaux sur l'aldéhyde salicylique. De leurs expériences, ils concluent : *L'existence de l'aldéhydase, diastase oxydante directe, est encore à démontrer.*

ROLE PHYSIOLOGIQUE DES OXYDASES

Les oxydations réalisées *in vitro* par les oxydases ont étayé trois hypothèses sur leur rôle physiologique.

Les oxydases interviendraient :

- 1° dans la production de composés organiques animaux et végétaux ;
- 2° dans la défense de l'organisme vivant ;
- 3° dans les combustions organiques.

1° Rôle des oxydases dans la production de composés organiques animaux et végétaux.

Nous avons vu que, d'après M. CHODAT, les oxydases participeraient à la production de l'urée animale, à celle des aldéhydes végétales et à la formation des pigments végétaux azotés ou non.

BOURQUELOT (148) estime, lui aussi, que les oxydases ne sont pas étrangères à la production des aldéhydes végétales.

2° Rôle des oxydases dans la défense de l'organisme vivant

Suivant M. PORTIER, les oxydases le défendent contre l'envahissement par les microorganismes.

Il appuie son opinion sur le rôle des oxydases végétales sur les faits suivants: les oxydases sont abondantes, dans les organes jeunes, fragiles, délicats, facilement vulnérables; elles n'existent qu'à la périphérie des végétaux, le produit de leur action sur le substratum d'oxydation est un vernis dur, résistant aux agents chimiques.

Les oxydases animales défendent l'organisme au niveau d'une plaie qui vient de se produire. Le mécanisme de leur action serait le suivant:

Les leucocytes du sang qui s'écoule sont en partie détruits, ils mettent en liberté leur fibrin ferment qui provoque la coagulation du sang et arrête l'hémorragie. Ils libèrent en même temps leur oxydase qui teint la fibrine.

La couche de fibrine qui est en contact avec l'atmosphère s'oxyde, s'insolubilise, devient probablement moins attaquable aux bactéries, et rétablit une barrière provisoire au niveau de l'épiderme lésé. Les couches sous-jacentes de fibrine subissent la fibrinolyse, l'oxydase passe en solution, les leucocytes, les phagocytes arrivent en très grand nombre, les uns s'emparent des bactéries qui avaient été introduites par le traumatisme, les autres s'appliquent sur les filaments de fibrine et édifient un tissu de cicatrice d'autant plus activement que l'oxydase a exalté leur vitalité.

Ce ne sont pas là de simples vues de l'esprit, M. Portier appuie son hypothèse sur les résultats des nombreuses expériences.

3° Rôle des oxydases dans les combustions organiques

a) OPINION DE M. BACH

M. Bach estime qu'on ne saurait nier la participation des ferments oxydants aux phénomènes d'oxydation qui se passent chez les êtres vivants.

Il déduit son opinion de la transformation *in vitro* des chromogènes en pigments, par les oxydases: *Les oxydases président à la transformation des chromogènes en pigments auxquels on s'accorde maintenant à reconnaître un rôle important comme réservoir d'oxygène faiblement combiné.*

b) OPINION DE M. LÆW

M. Læw suppose que le rôle physiologique de la lac-case est de transformer, par oxydation partielle, les produits benzéniques formés au cours du métabolisme.

CONCLUSIONS

En résumé, l'étude des travaux consacrés aux oxydases nous montre que de 1878 à 1894 de nombreux savants s'efforcèrent de découvrir *ces agents solubles qui président à toutes les oxydations de l'organisme* et qui furent pressentis par Claude Bernard.

En 1894, la laccase et la tyrosinase furent découvertes et le groupe des oxydases créé.

Pendant ces dernières années, on se préoccupa moins de découvrir de nouvelles oxydases que de préciser les propriétés de celles déjà connues. La recherche directe ayant fourni des résultats insuffisants, certains auteurs l'abandonnèrent. Ils préparèrent et étudièrent des systèmes chimiques, « des oxydases artificielles » douées du pouvoir oxydant des oxydases naturelles.

Malgré de très nombreux travaux d'analyse et de synthèse, les oxydases nous restent encore presque totalement inconnues.

Le rôle physiologique qu'on peut leur attribuer, sans dépasser les limites d'une hypothèse permise, apparaît comme secondaire.

DEUXIEME PARTIE

Réactions oxydasiques et brunissement de la pomme

I. — Etat des questions d'après les travaux antérieurs

Premier travail attirant l'attention sur le brunissement des tranches, du suc et de la pulpe de pomme. — Hypothèse de l'intervention d'une diastase oxydante — Travaux de M. Lindet.

Le brunissement des tranches, du suc et de la pulpe de pomme a été étudié pour la première fois, en 1893, par M. LINDET (150) qui, en 1895, attribua ce brunissement à l'action d'une oxydase (135).

« En 1893, écrit l'auteur, *en étudiant dans quelles circonstances le jus de pomme se colore au cours de la fabrication du cidre, j'ai été frappé de voir que les conditions d'oxydation du tanin contenu dans ces fruits, cor-*

respondent exactement aux conditions d'existence d'un ferment soluble, et j'ai annoncé que ce ferment soluble semble présider à cette oxydation. On ne connaissait à cette époque aucune diastase à fonction oxydante et j'avais attendu, pour exposer mes recherches à l'Académie, de pouvoir, par de nouvelles expériences, confirmer celles que je venais de publier. La découverte de M. Bertrand me permet d'être aujourd'hui plus affirmatif au sujet de la présence d'une diastase oxydante dans la pomme et d'exposer les expériences que j'ai établies pour la démontrer. »

Nous résumerons brièvement les expériences et les faits d'observation sur lesquels M. Lindet s'appuie pour affirmer l'existence d'une oxydase dans la pomme.

1° Des tranches, de la pulpe, du jus de pomme placés dans des cloches sur le mercure rougissent, et il y a absorption d'oxygène et dégagement d'anhydride carbonique, le volume d'oxygène absorbé est égal au volume d'anhydride dégagé. L'auteur estime que « cette action oxydante ne saurait être attribuée à un ferment figuré » puisqu'on observe les mêmes échanges gazeux avec du jus filtré sur bougie Chamberland et avec du jus additionné d'essence de moutarde.

2° Les antiseptiques, anesthésiques, poisons métalliques, acides, bases qui diminuent ou suppriment l'activité des diastases, diminuent ou suppriment le brunissement.

3° Le brunissement ne se produit plus quand la pulpe a été portée à une température suffisamment élevée.

4° L'addition d'alcool détermine dans le jus de la pomme la formation d'un précipité qui, dissous dans

l'eau, provoque le brunissement d'un jus bouilli, et le liquide séparé du précipité ne se colore pas à l'air.

5° La pomme broyée, coupée ou râpée « rougit » à l'air avec une grande rapidité.

6° Un tanin est présent dans la pomme. L'auteur l'a isolé à l'état impur, *encore souillé d'une partie des acides organiques qui l'accompagnent dans le fruit.*

On peut donc considérer, comme un fait établi, conclut M. Lindet, que c'est à l'action d'une diastase renfermée dans le tissu de la pomme et appartenant au type laccase, qu'est due l'oxydation du tanin de ces fruits, mais de nouvelles recherches sont nécessaires pour établir si cette diastase provoque directement l'oxydation ou si elle dédouble le tanin en molécules plus oxydables que lui.

M. Lindet a donc observé que, pendant le brunissement les tranches, la pulpe et le suc de pomme sont le siège d'une consommation d'oxygène et d'un dégagement d'anhydride carbonique. Il a analysé les conditions de ce brunissement qu'il reconnaît identiques aux conditions générales d'action des diastases et il en conclut que le brunissement est le témoin de l'activité d'une oxydase contenue dans le fruit.

M. Lindet n'a pas isolé cette oxydase, agent du brunissement et il n'a pas constaté sa présence dans le fruit à l'aide des réactifs généraux des ferments solubles oxydants directs.

Selon la très heureuse expression de M. J. Wolff (60), M. Lindet a mis en évidence dans la pomme à cidre, *l'influence d'une oxydase qui oxyde le chromogène de la pomme.*

Recherches du professeur Ewart, de Melbourne, sur les réactions oxydasiques et le brunissement de la pomme.

M. Ewart (152) donne le nom d'oxydases aux diastases qui activent l'oxygène moléculaire, ainsi qu'aux peroxydiastases et aux catalases.

Nous ne retiendrons de ses recherches que celles qui se rapportent à l'oxydase définie, *la diastase activant l'oxygène moléculaire*, puisqu'elle est le seul ferment oxydant de la pomme étudié dans notre travail.

M. Ewart suppose que l'oxydase de la pomme est localisée *dans le protoplasme et non dans le suc cellulaire*.

A son avis, le meilleur procédé d'extraction de cette oxydase est la macération, pendant 24 ou 48 heures des tranches de fruit dans la glycérine. Le liquide, séparé par décantation, présente des propriétés oxydasiques.

Nous reviendrons sur ce procédé de préparation, dont la scrupuleuse application ne nous a jamais permis d'extraire l'oxydase de la pomme.

M. Ewart signale que les propriétés oxydasiques des extraits glycélinés de pomme disparaissent à l'ébullition; que la pulpe de pomme, privée de son suc avant écrasement et dessiccation, ne perd pas son pouvoir oxydant par dessiccation à 15° et que, dans ces conditions, elle peut le conserver pendant plus de trois semaines; que, l'oxydase en solution garde ses propriétés pendant un long temps.

Les résultats que nous avons obtenus dans nos recherches sur la résistance de l'oxydase de la pomme au vieillissement ne confirment pas ceux de M. Ewart.

L'auteur a étudié l'action de quelques sels sur le brunissement à l'air, et le bleuissement avec la teinture de gayac du tissu de la pomme.

L'iodure, le bromure, le chlorure et fluorure de potassium, quand ils sont en excès, retardent ou empêchent le brunissement. Le fluorure a une action « antioxydasi-que » et les trois premiers sels ont une action retardatrice, à peine perceptible, sur le bleuissement. Le chlorure de baryum agit comme « antagoniste ».

M. Ewart conclut à la non destruction de l'oxydase, du fait que, débarrassée des sels en excès par lavages à l'eau, la pulpe, additionnée d'eau oxygénée, brunit à l'air et bleuit avec la teinture de gayac. Les partisans de la distinction entre oxydases et peroxydiastases tireraient de cette expérience une conclusion différente, à savoir que les sels étudiés, quand ils sont en excès, détruisent l'oxydase mais ne détruisent pas la peroxydiastase.

L'auteur a étudié l'influence de deux anesthésiques, le chloroforme et l'éther. Tous deux donnent une pulpe colorée en jaune, douée de propriétés oxydasiques.

Il signale trois réactions de coloration qu'il attribue à l'oxydase contenue dans le fruit : la pulpe se colore en violet puis en bleu avec le soluté alcoolique de paraphénylènediamine, et avec le soluté aqueux de tartrate de paraphénylènediamine ; les surfaces de section récentes de pomme bleussent quand on les recouvre d'iodure de potassium amidonné.

Pour M. Ewart, le chromogène de la pomme est une sorte de tanin. De ce que ce composé donne avec le perchlorure de fer une coloration verte et non pas bleue

ou noire, l'auteur estime qu'il s'agit d'un tanin catéchique, plutôt que d'un tanin gallique.

Dans le résumé qui termine son travail, M. Ewart consacre à l'oxydase de la pomme les seules lignes suivantes : *Si l'action spéciale de l'oxydase de la pomme sur le tanin est due à la présence d'un sensibilisateur phosphaté, elle serait une oxydase du même type, mais plus faible que les oxydases de la betterave et de la pomme de terre.*

Recherches de M^{me} Muriel Wheldale Onslow, sur les ferments oxydants de la pomme.

M^{me} Onslow a effectué de nombreuses recherches dans le but d'établir la nature des ferments oxydants des végétaux (153).

De ses travaux sur la pomme, elle conclut : *La pomme contient une oxydase qui est une oxygénase, une peroxydase et une substance aromatique avec le groupement catéchique. L'oxygénase active l'oxydation des composés aromatiques catéchiques situés dans la cellule avec production d'une couleur brune et d'un système qui bleuirait avec le gayac, elle activera aussi l'oxydation de la catéchine ajoutée artificiellement, avec production, en présence d'une peroxydase d'un système identique.*

Une quantité importante des composés aromatiques du fruit paraissent être sous la forme d'un tanin catéchique et ne peuvent pas être activés par l'enzyme in vitro.

Après enlèvement du tanin et de l'acide malique, le résidu des composés aromatiques est activé par l'oxygénase, avec difficulté, en solution, mais plus rapidement

quand des fragments de « tissu résidue » sont mis dans la solution.

Recherches de M. J. WOLFF sur le mécanisme de quelques phénomènes d'oxydation et de réduction dans les tissus de la pomme.

L'auteur (60) a observé que l'oxydase de la pomme présente la particularité d'adhérer fortement aux cellules et qu'on ne peut l'extraire par l'eau ou la glycérine.

M. J. Wolff a constaté qu'en humectant des tranches fraîchement sectionnées de pommes ou de poires, à l'aide d'une solution d'amidon soluble à 2 pour 100, renfermant 5 pour 100 d'iodure de potassium, on voit apparaître une coloration bleue, comme si de l'iode était mis en liberté sous l'influence d'un peroxyde et que toutes les fois que la réaction se produit avec intensité, on obtient également une réaction intense d'oxydases.

D'autre part, l'auteur a noté que la rapidité avec laquelle se forme le pigment brun est intimement liée à la rapidité des autres réactions. De ces observations, il conclut qu'une relation très étroite existe entre la formation du pigment sous l'influence de l'oxydase et le phénomène du bleuissement de l'amidon par décomposition de l'iodure de potassium.

Le mécanisme de cette décomposition a été mis en évidence, d'une façon très ingénieuse, par M. J. Wolff.

Conclusions

De cet examen rapide des travaux consacrés aux réactions oxydasiques et au brunissement de la pomme, il

ressort que les auteurs ont attribué à l'intervention de diastases contenues dans la pomme des réactions qui ont pour témoins des changements de couleur se produisant aux dépens :

1° De réactifs ajoutés (teinture de gayac, iodure de potassium amidonné, paraphénylènediamine, etc.), phénomènes analogues à ceux que l'on sait être dus à des oxydases ;

2° De substances existant dans le fruit et encore imparfaitement connues, appartenant sans doute au groupe des tanins, phénomènes complexes de nature encore mal précisée.

II. — RECHERCHES PERSONNELLES

Production, à l'aide de réactifs ajoutés à la pomme, de quelques-unes des réactions attribuées aux oxydases.

La teinture récente de résine de gayac versée sur des tranches de pomme les colore en bleu.

Le temps qui s'écoule entre l'application du réactif sur les tranches de fruit et l'apparition de la coloration est très variable. Dans les mêmes conditions de température, à la même époque de l'année et avec le même procédé de sectionnement, le bleuissement apparaît plus ou moins rapidement suivant les variétés de pomme. Il n'a jamais fait défaut dans les très nombreux essais que j'ai effectués.

Une relation semble exister entre la vitesse du bleuissement et son intensité : les tranches de pommes qui bleuisent le plus rapidement sont celles qui donnent la couleur bleue la plus intense.

Les *pommes broyées* se colorent instantanément en bleu avec la teinture de gayac (1). Je n'ai noté aucune différence sensible dans les vitesses du bleuissement des pulpes des diverses variétés de pommes étudiées.

(1) Pour éviter des longueurs, nous désignerons sous ce nom la teinture récente de résine de gayac.

Le suc obtenu par expression de la pulpe dans un linge se colore en bleu avec la teinture de gayac (1).

A la température de $+12^{\circ}$, $+18^{\circ}$, la coloration bleue produite est très pure. A température plus élevée, les tranches, et surtout la pulpe et le suc, brunissant très rapidement au contact de l'air, la coloration est vert bleuâtre. Elle est due au mélange du bleu et du brun.

Les pommes qui donnent avec la teinture de gayac la coloration bleue la plus rapide et la plus intense sont celles qui brunissent le plus rapidement et le plus intensément.

L'eau gayacolée saturée ne donne pas avec la pomme la réaction qu'elle fournit avec les oxydases, type laccase. L'explication de ce fait a été donnée par M. J. Wolff (154). *L'oxydation du tanin sous l'influence de la laccase empêche ou masque complètement la réaction du gayacol. Il ne faut donc pas s'étonner si dans un grand nombre de végétaux, riches en laccase, contenant soit du tanin, soit de la pyrocatechine, la réaction du gayacol est masquée.*

Les solutions aqueuses de pyrogallol et d'hydroquinone traitées par des sucs de pomme, que la teinture de gayac colore en bleu, ne m'ont donné ni purpurogalline, ni quinone.

La solution alcoolique de benzidine (benzidine : 1gr., alcool à 50° : 100 gr.) colore lentement en violet foncé, les tranches, la pulpe et le suc de pomme.

(1) La teinture utilisée dans tous ces essais est obtenue avec : résine de gayac, non oxydée, un gramme — alcool éthylique à 60° , cent grammes. Pour éviter les causes d'erreur dues à la formation d'eau oxygénée, nous préparons, chaque matin, la quantité de réactif susceptible d'être utilisée dans la journée.

Toutes les pommes essayées ont donné une coloration bleue avec l'iodure de potassium amidonné.

La pomme donne donc bien avec la teinture de gayac, la solution alcoolique de benzidine et l'iodure de potassium amidonné les réactions attribuées aux oxydases type laccase.

Localisation de l'oxydase dans le fruit

Pour déterminer cette localisation, j'ai partagé des pommes en quatre, par décollement des cellules, l'emploi du couteau pouvant étaler à la surface des cellules profondes du mésocarpe un peu du contenu des cellules superficielles. J'ai pris trois des fragments obtenus, j'ai déposé une goutte de teinture de gayac sur la partie externe de l'un, une goutte sur la partie moyenne du deuxième et une goutte sur la partie interne du dernier. Dans les trois essais, une coloration bleue intense est apparue, plus ou moins rapidement.

C'est la partie voisine des loges qui se colore avec le plus d'intensité. La pelure et les loges, soigneusement débarrassées de toute trace de mésocarpe, ne donnent pas de coloration bleue, même après broyage.

Les pépins broyés ne se colorent pas en bleu.

L'oxydase est donc localisée dans le mésocarpe et elle est plus abondante dans le voisinage des loges.

Tentatives d'extraction de l'oxydase

1° Tentative d'extraction sous forme de « poudre-ferment ».

L'étude d'une diastase ne peut être faite avec quelque

précision que si elle a été isolée à l'état de « poudre ferment », aussi est-ce sous cette forme que j'ai, tout d'abord, tenté d'isoler l'oxydase de la pomme.

J'ai employé, en premier lieu, le procédé le plus utilisé pour l'extraction des oxydases végétales, la précipitation par l'alcool fort. Ce procédé a servi à M. G. Bertrand pour la préparation de la laccase, à M. Sarthou pour celle de la schinoxydase et à M. Staub pour celle de la tyrosinase de la pelure de pomme de terre.

Des essais préliminaires m'ont montré que le suc n'entraîne pas la totalité de l'oxydase de la pomme, il paraît même n'en entraîner qu'une faible partie, puisque la pulpe séparée donne avec la teinture de gayac une coloration bleue, en apparence aussi intense qu'avant l'expression. J'ai constaté que tout le catalyseur n'est pas enlevé, en remplaçant le simple broyage par une trituration prolongée en présence de poudre de verre.

Pour l'extraire par précipitation alcoolique, j'ai adopté la technique suivante :

Dans un mortier en porcelaine, j'ai broyé rapidement des fragments de pomme pelée (1). La bouillie obtenue a été exprimée dans un carré de toile très serrée, maintenue, au préalable, pendant un quart d'heure dans de l'eau distillée bouillante et séchée à l'abri des poussières atmosphériques. Le liquide brun qui s'écoule et que la teinture de gayac colore en bleu a été reçu dans de l'alcool à 97°, constamment agité, pour permettre le contact intime du suc et de l'alcool.

Il se forme une masse gélatineuse jaune pâle. Après

(1) Dans toutes mes expériences, les pommes ont été pelées et coupées avec un couteau à lame de vermeil.

l'avoir séchée entre des doubles de papier filtre, je l'ai dissoute dans la plus petite quantité d'eau distillée possible. La liqueur obtenue, d'aspect laiteux, a été additionnée de trois à quatre fois son volume d'alcool éthylique à 97°.

Le précipité gélatineux formé a été exprimé entre des doubles de papier filtre, étalé sur des verres de montre et séché dans le vide sulfurique.

J'ai obtenu une masse cornée, jaunâtre, soluble dans l'eau. Sa solution aqueuse ne se colore pas en bleu par addition de teinture de gayac.

Dans les conditions opératoires adoptées, le procédé de précipitation par l'alcool fort se montre donc impropre à l'extraction de l'oxydase. Il semble que l'oxydase contenue dans le suc ait été « détruite » par l'alcool.

Après séparation du précipité, l'alcool présente une coloration vert pâle. Il vire au vert foncé par addition d'une solution aqueuse de perchlorure de fer au vingtième. Il donne la réaction que M^{me} Onslow considère comme spécifique des composés possédant deux oxhydryles phénoliques en position ortho : additionné de perchlorure de fer en solution aqueuse à 1/100°, puis d'une solution aqueuse diluée de carbonate de sodium pur, il se colore en vert foncé qui vire au bleu pourpre et enfin au rouge pourpre.

Cette dernière réaction semble prouver que l'alcool a enlevé au suc, entre autres constituants, des composés catéchiques et la première que ces composés sont des tanins.

Après ce premier essai, j'ai tenté d'extraire l'oxydase en la fixant sur un précipité gommeux. A cet effet, j'ai

ajouté à du suc de pomme, un tiers de son volume d'une solution aqueuse concentrée de gomme arabique. L'oxydase de la gomme a été préalablement détruite par ébullition de la solution.

Le mélange suc de pomme, solution de gomme arabique, après une agitation énergique d'une dizaine de minutes; a été abandonné quatorze heures, à la température de 14 à 16°. Le liquide a alors été additionné de trois volumes d'alcool éthylique à 95°. Il y a eu formation d'un précipité abondant. Le précipité, séparé par centrifugation, a été dissous dans une petite quantité d'eau distillée. A la liqueur, j'ai ajouté 3 à 4 volumes d'alcool à 95°. Le précipité, séparé par centrifugation, a été séché dans le vide sulfurique.

J'ai obtenu des écailles translucides, blanc jaunâtre, qui, dissoutes dans l'eau distillée, fournissent un liquide louche, ne bleuissant pas avec la teinture de gayac.

CONCLUSIONS. — L'oxydase de la pomme ne peut être extraite ni par précipitation alcoolique, ni par entraînement sur un précipité gommeux.

2° Tentative d'extraction sous forme d'un liquide doué de propriétés oxydasiques

EMPLOI DE LA GLYCÉRINE COMME DISSOLVANT

Dans une première série d'essais, j'ai utilisé le procédé indiqué par Bourquelot pour la préparation du ferment oxydant des champignons. C'est le procédé considéré par M. J. Ewart, comme le procédé de choix pour l'extraction de l'oxydase de la pomme.

Des tranches minces de fruit pelé sont mises à macérer

avec deux fois leur poids de glycérine. Le liquide jaune pâle, séparé par décantation, après vingt-quatre heures de contact, ne bleuit pas par addition de teinture de gayac.

Supposant que la viscosité de la glycérine pouvait apporter un retard à la dissolution de la diastase, j'ai porté la durée de macération à quinze jours. J'ai essayé, chaque jour le macéré avec de la teinture de gayac, à aucun moment je n'ai obtenu de coloration bleue.

En présence de ce résultat, j'ai pensé que la prolongation de la durée de la macération était insuffisante pour vaincre les difficultés de la dissolution dues à la viscosité de la glycérine.

Dans une deuxième série d'expériences, j'ai alors broyé avec du verre pilé des fragments de pomme pelée. La bouillie obtenue a été très longuement triturée dans un mortier de porcelaine, avec un poids de glycérine égal à deux fois celui de la pomme mise en expérience. Le liquide séparé par filtration ne donne pas de coloration bleue avec la teinture de gayac, même après plusieurs jours de contact avec la pulpe.

Les mêmes résultats ont été obtenus avec de très nombreuses variétés de pommes, et avec des glycérines de marques différentes.

L'acidité des glycérines ne peut être incriminée, l'acidité des échantillons utilisés a varié de 0 gr. 049 à 0 gr. 051, en SO^4H^2 , par kilogramme.

La glycérine ne saurait donc être utilisée pour l'extraction de l'oxydase de la pomme.

Ce liquide détruit-il l'oxydase ? Non, puisque après lavage à l'eau distillée, des tranches ou de la pulpe, res-

tées vingt-quatre heures en contact avec de la glycérine, donnent une coloration bleue avec la teinture de gayac.

EMPLOI DE VAPEURS FROIDES DE LIQUIDES ORGANIQUES

Dans une série de publications (155), sur lesquelles je reviendrai, M. R. Dubois a montré que les vapeurs de quelques liquides organiques neutres, volatils, susceptibles de produire l'anesthésie générale agissent sur la substance organisée en chassant *des tissus, principalement l'eau qui entraîne avec elle surtout des cristalloïdes et parfois même des colloïdes, par exemple des zymases, telles que la luciférase (Dubois), le ferment hépatique (Dastre).*

En m'inspirant des travaux de M. R. Dubois et de M. Mirande, j'ai cherché si l'oxydase de la pomme était entraînée par le liquide exsudant du fruit sous l'influence des vapeurs de chloroforme, d'acétone et d'éther ordinaire.

Dans mes expériences, j'ai adopté la technique et le dispositif suivant :

Sur un plan en verre dépoli, je dispose un large cristalliseur et au centre du cristalliseur, je place un flacon sur le col duquel repose un entonnoir très évasé. Le liquide, dont on veut étudier l'action des vapeurs, est contenu dans le cristalliseur. Une pomme est suspendue à l'aide d'un filet de coton blanc, au-dessus de l'entonnoir. Le dispositif est recouvert d'une cloche suiffée, pourvue d'un tube à robinet et j'enlève une partie de l'air de la cloche à l'aide d'une trompe à vide.

La pomme est alors abandonnée à l'action des vapeurs

pendant quarante-huit heures, à une température comprise entre 15 et 18°.

Les phénomènes observés sont identiques à ceux décrits par M. R. Dubois: coloration brune du fruit et exsudation à sa surface de gouttelettes de liquide.

La teinture de gayac n'a coloré en bleu aucun des liquides recueillis.

L'oxydase de la pomme n'a donc pas été entraînée par le liquide exsudant du fruit sous l'action des vapeurs d'éther ordinaire, de chloroforme ou d'acétone.

Le procédé signalé par Wittich pour l'extraction de certaines diastases, action de l'éther ordinaire saturé d'eau, ne m'a pas permis non plus d'isoler cette oxydase.

EMPLOI DE DIVERS LIQUIDES ORGANIQUES

J'ai cherché si des liquides organiques étaient susceptibles d'entraîner l'oxydase de la pomme, j'ai étudié l'action du chloroforme, de l'éther ordinaire, de l'acétone, de l'alcool éthylique à 60 et à 90°. A cet effet, j'ai triture, avec du verre pilé, dans un mortier en porcelaine, une partie de pomme avec deux parties en poids du corps étudié. Le liquide, séparé par filtration de la bouillie, a été essayé avec la teinture de gayac.

Toutes les pulpes se sont colorées plus ou moins rapidement en brun intense, au contact des liquides.

Le chloroforme et l'éther ordinaire fournissent un filtrat incolore que la teinture de gayac ne colore pas en bleu.

Le filtrat obtenu avec *l'acétone* est jaune pâle, il passe au verdâtre avec le réactif.

L'alcool éthylique à 60° donne un liquide jaunâtre que la teinture de gayac colore en bleu pâle.

L'alcool éthylique à 90° fournit, après dix minutes de contact, une pulpe incolore, brunissant avec le temps, et un filtrat vert pâle, virant peu à peu au jaune et ne donnant pas de réaction oxydasique sensible.

Des cinq liquides étudiés, l'alcool éthylique à 60°, seul, entraîne une petite quantité d'oxydase.

L'oxydase a-t-elle été détruite, ou n'est-elle qu'insoluble dans ces liquides ?

Après un contact de dix minutes avec le liquide étudié, les pulpes recueillies sur l'entonnoir et séchées entre des doubles de papier filtre donnent toutes une coloration bleue intense avec la teinture de gayac. L'oxydase n'est donc pas détruite, du moins totalement.

Après 24 heures de contact avec le liquide en expérience, les pulpes ne se colorent plus qu'en verdâtre avec le réactif.

L'alcool éthylique à 60° et celui à 90°, l'éther ordinaire, le chloroforme et l'acétone, pas plus que la glycérine, ne permettent d'extraire l'oxydase de la pomme.

EMPLOI DE L'EAU COMME SOLVANT

Si on broye une partie de pomme avec deux parties d'eau distillée, on obtient une bouillie qui, par filtration, donne un liquide que la teinture de gayac colore légèrement en bleu. Ce liquide, en tant que réserve de diastase, offre un double inconvénient : 1° il possède une coloration brun foncé qui masque la réaction donnée avec le gayac ; 2° il perd son pouvoir oxydasique en quelques

heures. Cette disparition du pouvoir oxydasique n'est pas due à l'intervention de ferments figurés. La bouillie a été filtrée sur papier imprégné de toluène et j'ai constaté que les liquides, conservés sous une couche de trois à quatre millimètres de cet antiseptique, perdaient aussi rapidement leur pouvoir oxydasique que ceux gardés en l'absence de ce conservateur.

CONCLUSION

Ces essais montrent que l'oxydase de la pomme ne peut être extraite par les procédés généraux d'extraction des oxydases végétales, et qu'elle ne semble pas pouvoir être séparée de la pulpe.

Production d'une réaction aux dépens d'une substance contenue dans la pomme, réaction ayant pour témoin un changement de couleur (brunissement).

Une pomme coupée, broyée ou râpée brunit à l'air; ce phénomène, d'observation si courante, est très imparfaitement connu au point de vue scientifique.

Beaucoup de personnes admettent encore que le brunissement est dû à la formation de tannate de fer aux dépens du métal de la lame du couteau. Cette opinion ne peut être soutenue, le tannate de fer est noirâtre et non pas brun-rouge et, d'autre part, le brunissement apparaît sur les surfaces de section des pommes coupées avec du verre ou avec des couteaux à lame de vermeil.

On a signalé une relation entre les conditions du sectionnement et la vitesse et l'intensité du brunissement. Il est d'autant plus rapide et plus intense que l'instrument « mâche » davantage le tissu. La surface de section d'une pomme coupée avec un morceau de verre brunit davan-

tage et plus vite que celle d'une pomme coupée avec un couteau très aiguisé, et celle-ci brunit plus que la surface d'une pomme divisée par décollement des cellules. Il m'a été donné de faire cette observation dans des conditions un peu spéciales. Avec les deux coupe-pommes utilisés dans quelques-unes de mes expériences, la section du fruit était si rapide que le déchirement des tissus était réduit au minimum et le plus souvent, la surface de section de la pomme coupée brunissait moins et plus lentement que celle d'une pomme divisée par décollement des cellules. Aussi, ai-je dû faire recouvrir la surface des lames des couteaux d'un réseau de fines cannelures déterminant, au passage, le broyage du tissu.

J'ai déjà dit que les pommes qui brunissent le plus rapidement à l'air sont celles qui bleussent le plus vite avec la teinture de gayac.

Influence de divers agents physiques sur le bleuissement de la pomme avec la teinture de gayac et sur son brunissement à l'air.

1° INFLUENCE DU TEMPS

Dans mes expériences, le suc était placé dans des tubes à essais, fermés par des tampons de coton hydrophile, pour mettre leur contenu à l'abri des poussières atmosphériques. J'ai versé à la surface du suc de la moitié de ces tubes, une couche de deux à trois millimètres de toluène.

La pulpe a été étalée sur des soucoupes, placées à l'abri des poussières; une moitié de la pulpe a été préalablement additionnée de quelques gouttes de toluène. Dans

la moitié des soucoupes à pulpe non toluénée et dans la moitié de celles à pulpe toluénée, j'ai versé de l'eau distillée de façon à avoir une couche liquide d'un centimètre de hauteur environ.

Quand ils viennent d'être préparés, le suc et la pulpe de pomme se colorent en bleu avec la teinture de gayac.

La coloration brune du suc et de pulpe augmente rapidement, de telle sorte que, peu de temps après leur préparation, l'addition de teinture de gayac donne une coloration verte qui résulte du mélange du bleu et du brun.

Dix heures environ après sa préparation, le suc, toluéné ou non, ne donne plus de coloration verte avec la teinture de gayac.

Vingt-quatre heures environ après sa préparation, la pulpe, toluénée ou non, gardée sous l'eau ou non, ne donne plus de réaction avec le gayac.

Les ferments figurés n'interviennent pas dans la disparition du pouvoir de bleuir, puisque le suc et la pulpe toluénés donnent des résultats identiques à ceux fournis par la pulpe et le suc gardés en l'absence de conservateur.

L'absence d'eau n'explique pas la persistance plus longue du bleuissement dans la pulpe.

2° INFLUENCE DE LA CHALEUR

a) Sur la réaction du bleuissement du mésocarpe et du suc

Pour déterminer cette influence sur le mésocarpe, j'ai adopté la technique suivante qui, seule, permet de connaître exactement la température à laquelle la pomme est soumise.

Dans chaque pomme, j'ai introduit un thermomètre à mercure, de façon à ce que le réservoir soit à peu près

au centre du fruit. Pour éviter la pénétration de l'oxygène atmosphérique dans l'intérieur de la pomme, j'obture soigneusement l'ouverture faite avec de la cire à cacheter. Les pommes ainsi préparées sont mises dans une étuve portée et réglée à la température dont on veut étudier l'influence. Je compte comme actif le temps qui s'écoule à partir du moment où la température intérieure du fruit est égale à celle de l'étuve.

Des résultats obtenus dans un grand nombre d'essais, effectués avec des pommes d'espèces différentes (reinette grise, reinette du Canada, calville rouge), on peut conclure qu'un chauffage de quinze minutes, à 70° est suffisant pour empêcher le mésocarpe de donner une coloration bleue avec la teinture de gayac.

Je dois signaler que quelques pommes ne bleussent plus après chauffage à 65° alors que d'autres bleussent encore après chauffage à 75°. Ce fait n'a rien de surprenant. M. Staub a établi que la « température mortelle » de la tyrosinase varie avec le milieu dans lequel elle se trouve, on peut admettre avec vraisemblance que cette propriété est commune à toutes les oxydases. Or, les pommes présentent des compositions chimiques variables avec leur origine, leur degré de maturation, les procédés de conservation qui se montrent plus ou moins favorables à leur déshydratation.

Pour déterminer l'influence de la chaleur sur le bleuissement du suc, je place quelques tubes à essais garnis de suc dans une étuve maintenue à la température dont on veut étudier l'action. Je laisse chaque tube dix minutes dans l'étuve à partir du moment où le thermomètre qui plonge dans chacun d'eux indique que leur contenu est

en équilibre de température avec l'atmosphère intérieure de l'étuve.

Quand le suc a repris la température du laboratoire, je l'additionne de teinture de gayac.

Une température de 60 à 70°, maintenue dix minutes, empêche le bleuissement.

b) *Sur le brunissement*

Dans certaines limites de température, le brunissement est d'autant plus intense et plus rapide que la température est plus élevée: à 35°, la pulpe et le suc brunissent davantage et plus vite que les témoins laissés à 14°.

Les températures qui empêchent le bleuissement empêchent le brunissement.

Un agent modifie ou supprime une réaction diastatique en agissant soit sur le ferment, soit sur le substratum de transformation. M. J. Wolff a établi que les phosphates alcalins qui favorisent l'oxydation du gayacol par le suc de russule retardent, dans les mêmes conditions, celles de l'alizarine sulfo-conjuguée, de la cochenille, de l'orcine et celle des matières colorantes des fleurs. Des essais, sur la signification exacte desquels il est difficile d'être fixé, semblent établir qu'ici la chaleur porte son action sur l'oxydase et non sur le substratum de transformation. La pulpe qui, après chauffage suffisant, ne brunit plus, donne les mêmes réactions que la pulpe non chauffée, elle jaunit au contact des solutions normales de potasse et de soude et elle verdit par addition de la solution de perchlorure de fer à 1/20°. Le composé tannique, considéré, par la plupart des auteurs, comme le

constituant de la pomme qui subit l'oxydation ne semble donc pas avoir été modifié par la chaleur.

3° INFLUENCE DE LA LUMIÈRE

La lumière ne semble pas avoir d'influence sur le bleuissement.

Elle a une action accélératrice sur le brunissement de la pulpe.

Influence de divers agents chimiques (solutions aqueuses d'électrolytes) sur le bleuissement de la pomme avec la teinture de gayac et sur son brunissement à l'air.

1° INFLUENCE DE QUELQUES SELS EN SOLUTION AQUEUSE

Pour ces essais, j'ai adopté le mode opératoire suivant : dans un mortier en porcelaine, je triture une partie de pomme pelée avec deux parties de solution. La bouillie obtenue est abandonnée pendant une heure ; ce temps écoulé, je note sa coloration, et je traite par de la teinture de gayac la pulpe séparée par filtration et séchée entre des doubles de papier filtre.

Pour la plupart des sels étudiés, j'ai utilisé des solutions normales, aucune des solutions employées ne donne de coloration bleue avec la teinture de gayac. Ces essais ont été effectués à une température variant de 15 à 18°. Dans chaque série d'essais, un témoin a été préparé avec de l'eau distillée.

A. — *Sels alcalins et alcalino-terreux*

Je réunis dans le tableau suivant les résultats obtenus :

SELS	Variétés de pommes utilisées	Réaction de la teinture de Gayac sur la pulpe après une heure	Apparition du brunissement	Brunissement de la bouillie après une heure
Témoin	I (1) II (2)	Positive »	Immédiate »	Intense »
Cl Na N/1	I II	» Faiblement positive	En 20' environ » 40-45' »	< Léger
Br Na N/1	I II	Positive »	En 5' environ » 10' »	< »
I K N/1	I II	Positive Faiblement positive	En 20' environ » 30 à 35'	» Léger
Br K N/1	I II	Positive »	En 10' environ » 15' »	< <
No³ K N/1	I II	Positive »	Immédiate »	< <
Clo³ K N/1	I II	» »	En 2 à 3' »	Intense »
So⁴ Mg N/1	I II	» »	» »	» »
Cl² Ba N/1	I II	Faiblement positive »	En 40 à 45' »	Léger »

(1) Pomme à pelure verte.
(2) Pomme à pelure jaune.
< Inférieur au témoin.

SELS	Variétés de pommes utilisées	Réaction de la teinture de gayac sur la pulpe après une heure	Apparition du brunissement	Brunissement de la bouillie après une heure
$\text{Cl}^2 \text{Ca}$ N/1	I	Faiblement positive	En 30 à 35'	Léger
	II	»	»	»
$(\text{CH}^3 \text{Co}^2)^2 \text{Ca}$ N/1	I	Positive	En 5 à 10'	<
	II	»	»	»
$\text{Cl}^2 \text{Sr}$ N/1	I	Faiblement positive	En 40 à 45'	Léger
	II	»	»	»

B. — Sels appartenant au groupe des antiseptiques métalliques.

Voici les résultats obtenus en traitant des pommes par les solutions aqueuses de quelques-uns de ces sels :

SELS	Variétés de pommes utilisées	Réaction de la teinture de gayac sur la pulpe après une heure	Apparition du brunissement	Brunissement de la bouillie après une heure
Hg Cl^2 N/10	I	Légèrement positive	En 40 à 50'	Léger
	II	»	»	»
Hg Cy^2 N/10	I	»	»	»
	II	»	»	»
$\text{So}^4 \text{Zn}$ N/10	I	Positive	En 5 à 10'	<
	II	»	»	<
F Na N/10	I	Négative		Nul
	II	»		»
F Na N/100	I	Positive	En 20'	<
	II	»	»	<

De l'examen de ces deux tableaux, on peut tirer plusieurs conclusions :

1° Des antiseptiques métalliques étudiés, le fluorure de sodium seul, en solution N/10, a empêché le bleuissement et le brunissement ;

2° Le pouvoir empêchant du fluorure de sodium ne peut pas être attribué à l'ion sodium, puisque d'autres sels de ce métal ont permis le brunissement et le bleuissement, même au titre N/1.

En présence du résultat obtenu avec le fluorure de sodium, il m'a paru nécessaire d'examiner si ce sel n'agit pas comme précipitant du calcium ou comme inhibiteur du phénomène diastasique. J'ai institué, à cet effet, une série d'expériences dont voici le détail.

C. — Influence des fluorures et oxalates

On prend six mortiers et on met, dans chacun d'eux, dans une expérience, 5 cm³, dans une deuxième expérience 10 cm³, et dans une troisième expérience 20 cm³, respectivement de chacun des liquides : eau distillée — solution N/10 de fluorure de sodium, de fluorure d'ammonium, d'oxalate de potassium, d'oxalate d'ammonium et d'acétate de calcium. On broie rapidement, dans chacun des liquides, 1/8 de pomme pelée.

Après cinq minutes, on observe :

	Eau distillée	Fluorure de sodium n/10	Fluorure d'ammonium n/10	Oxalate de potassium n/10	Oxalate d'ammonium n/10	Acétate d. calcium n/10
Bleuissement.	+	0	0	0	0	+
Brunissement	+	0	0	0	0	+

Dans les trois expériences, on ajoute alors dans chacun

des mortiers contenant un oxalate ou un fluorure, le même volume, plus 5 c. de solution N/10 d'acétate de calcium et on observe :

	Fluorure de sodium n/10	Fluorure d'ammonium n/10	Oxalate de potassium n/10	Oxalate d'ammonium n/10
Bleuissement.	+	+	+	+
Brunissement	+	+	+	+

J'ai vérifié: 1° qu'il y a un excès de calcium en solution après l'addition d'acétate; 2° que les mélanges: fluorure et acétate, oxalate et acétate ne donnent pas de coloration bleue avec le gayac.

L'acétate de calcium n'est, du reste, pas le seul sel, dont l'addition rétablisse ainsi le pouvoir de bleuir avec le gayac et celui de brunir, à l'air; en effet d'autres sels solubles de calcium et des acétates alcalins font de même, mais moins régulièrement et moins intensément.

DOSAGE DU CALCIUM. — J'ai accompagné ces essais d'une recherche et du dosage du calcium dans une pomme.

Les pommes, coupées en tranches minces, ont été mises dans une étuve électrique dont on a élevé progressivement la température jusqu'à 100°. Après dessiccation complète, les tranches ont été incinérées dans une capsule de platine, dans un four en quartz fondu à chauffage jusqu'à obtention de cendres blanches. Les cendres ont été dissoutes dans de l'acide chlorhydrique pur et la liqueur évaporée à siccité au bain-marie. Le résidu a été repris par de l'acide sulfurique au quart et la solution a été évaporée à siccité.

Le nouveau résidu a été dissous à chaud dans de l'eau distillée; à la liqueur, on a ajouté deux volumes d'alcool à 90° et le produit a été abandonné à lui-même pendant 24 heures. Le précipité de sulfate de calcium, séparé par centrifugation du liquide surnageant, a été desséché à l'étuve, puis chauffé fortement et pesé après refroidissement.

J'ai obtenu comme teneur des cendres en calcium :
15,71 pour 100, en CaO.

Les pommes possédant des réactions oxydasiques, on pouvait, avec vraisemblance, soupçonner la présence du fer ou du manganèse ou la présence simultanée de ces deux métaux dans ces fruits.

Dans des cendres redissoutes, j'ai recherché le fer par le sulfocyanate d'ammonium, et le manganèse par le procédé de G. Bertrand (147). Les deux recherches ayant été positives, j'ai effectué le dosage de ces métaux.

Dosage du fer. — Je l'ai dosé, colorimétriquement, par la technique de Lapicque (151), en me servant d'un colorimètre Duboscq.

Les cendres blanches, obtenues comme il a été indiqué pour le dosage du calcium, ont été dissoutes par addition d'acide chlorhydrique pur et concentré. Cette solution a été évaporée au bain-marie et le résidu repris par quelques gouttes d'acide nitrique. La solution a été évaporée à siccité et le nouveau résidu dissous dans quelques centimètres cubes d'acide sulfurique. Cette solution, étendue d'une quantité convenable d'eau distillée, m'a servi pour le dosage.

La teneur moyenne des cendres en fer a été de :
0,134 pour 100 en Fe O.

Dosage du manganèse. — J'ai utilisé le procédé G. Bertrand, au persulfate de potassium.

Dans ces dosages, j'ai pris toutes les précautions d'usage: emploi d'un matériel soigneusement nettoyé, utilisation d'eau bidistillée dans des appareils en verre, manipulations à l'abri des poussières atmosphériques, etc.

J'ai préparé le sulfate de manganèse en suivant scrupuleusement les indications données par M. G. Bertrand, à savoir: amener le métal sous une forme aisément soluble dans l'acide azotique, éliminer toute trace de charbon et de chlorures.

Le manganèse du sulfate obtenu a été transformé en permanganate de potasse, en traitant à chaud, la solution azotique du sel par un excès de persulfate de potassium, en présence d'azotate d'argent. Le manganèse a été dosé colorimétriquement (à l'aide d'un colorimètre Duboscq).

La teneur moyenne des cendres en manganèse a été de:

0,0097 pour 100.

Les pommes renferment donc des quantités de calcium, de fer et de manganèse permettant de supposer que ces métaux jouent un rôle dans les réactions oxydasiques données par ces fruits.

2° INFLUENCE DES ACIDES ET DES ALCALIS

Pour déterminer cette influence, j'ai utilisé la même technique que dans l'étude de l'influence des sels métalliques, mais j'ai noté, après dix minutes, la coloration de la bouillie et l'action de la teinture de gayac sur la pulpe.

En raison de l'action brutale qu'ils exercent sur la matière organique, les acides et les alcalis concentrés ne

présentent aucun intérêt dans la question qui nous occupe. Je me suis bornée à étudier l'action des solutions normales, décimales et centimales de divers acides et de quelques bases.

A. — Influence des acides en solution aqueuse

Les résultats obtenus sont groupés dans le tableau suivant :

Solutions acides utilisées		Coloration donnée par la teinture de gayac avec la pulpe après 10'	Coloration de la pulpe après 10'
H Cl	N	Nulle	Nulle
NO ³ H	»	»	»
SO ⁴ H ²	»	»	»
Malique	»	»	»
Citrique	»	»	»
Tartrique	»	»	»
Oxalique	»	»	»
Acétique	»	B eue	Jaune
Azotique	N/10	Nulle	Nulle
Sulfurique	»	»	»
Chlorhydrique	»	»	»
Malique	»	»	»
Oxalique	»	»	»
Acétique	»	Bleue	Jaune
Succinique	»	»	»
Lactique	»	»	»
Citrique	»	»	»
Tartrique	»	»	»
Oxalique	N/100	Nulle	Nulle
Sulfurique	»	Bleue	Jaune
Azotique	»	»	»
Chlorhydrique	»	»	»
Malique	»	»	»

Il ressort donc de cette étude :

1° Que l'acide acétique en solution normale se distingue

nettement des autres acides organiques étudiés, qui, à la même dilution, se comportent comme les solutions N/1 des acides sulfurique, chlorhydrique, et azotique;

2° Que les acides malique et oxalique, en solution N/10, se comportent, comme ces acides minéraux même, à la dilution;

3° Que, des solutions N/100 d'acides étudiés, seule la solution N/100 d'acide oxalique empêche le brunissement et le bleuissement.

Les acides détruisent-ils l'oxydase, ou créent-ils simplement un milieu impropre à l'action oxydasique ?

S'ils ne font que créer un milieu impropre à l'action oxydasique, en neutralisant de suite et exactement l'acide, on doit permettre à l'oxydase de manifester sa présence. Il devra en être ainsi du moins, avec les solutions normales et décimales d'acides chlorhydrique et azotique, puisque j'ai pu constater que, dans certaines conditions expérimentales, 10 cc. de solution normale de chlorure de sodium ou d'azotate de potassium ne s'opposaient ni au brunissement, ni au bleuissement.

J'ai trituré cinq grammes de pommes avec 10 cc. de solution N/10 d'acide chlorhydrique, dès obtention d'une bouillie homogène, soit deux minutes après l'addition de l'acide, j'ai ajouté la quantité de solution de soude décimale susceptible de neutraliser exactement l'acide.

Le produit obtenu ne se colore pas en bleu avec la teinture de gayac et ne brunit pas à l'air.

Des résultats semblables ont été fournis par les autres acides.

On peut donc admettre, avec vraisemblance, que les acides exercent une action sur l'oxydase elle-même.

INFLUENCE DES ALCALIS EN SOLUTION AQUEUSE

Si l'on broie cinq grammes de pommes avec dix centimètres cubes d'une solution N de potasse, de soude ou d'ammoniaque, on obtient une bouillie qui, rapidement, se colore en brun beaucoup plus intense que le témoin préparé avec de l'eau distillée et la pulpe, séparée après quelques minutes et séchée entre des doubles de papier filtre, ne donne pas de coloration bleue avec la teinture de gayac.

Avec les solutions N/10 d'alcalis, on observe tout d'abord l'apparition d'une coloration vert pâle qui vire plus ou moins rapidement au brun. La pulpe, séparée, après quelques minutes de contact avec le réactif, se teinte en bleu pâle avec la teinture de gayac. Après une heure, la coloration brune de la bouillie est plus foncée que celle du témoin.

Si, au lieu de broyer les fragments de pomme dans le réactif, on les plonge dans ce liquide, on constate que les fragments restent incolores, alors que la solution se colore en brun. Le pigment brun, formé à la surface des morceaux de pomme immergés, se dissout dans la liqueur alcaline au fur et à mesure de sa production. En effet, si on sort un fragment de pomme du liquide, il brunit intensément en moins de dix minutes, alors que ceux immergés ne brunissent qu'en trente minutes environ, quand le liquide est d'un brun intense.

Non seulement les alcalis augmentent le brunissement des pommes susceptibles de brunir à l'air, mais encore ils font brunir celles qui ont perdu ce pouvoir par chauff-

fage, par action des acides dilués ou des solutions de fluorure ou d'oxalate.

Influence de diverses vapeurs sur le bleuissement de la pomme avec la teinture de gayac et sur son brunissement.

A. — Influence de vapeurs saturantes à froid, en présence d'air.

Ainsi que je l'ai exposé précédemment, l'impossibilité d'extraire l'oxydase de la pomme par dissolution dans la glycérine, ou par précipitation par l'alcool fort, m'a conduite à tenter son extraction par le procédé indiqué par M. R. Dubois: action sur le fruit de vapeurs de liquidés organiques, susceptibles de jouer le rôle d'anesthésiques.

Dans ces essais, j'ai pu observer les phénomènes, si minutieusement décrits par M. R. Dubois: changement de coloration de la pelure, changement d'aspect du mésocarpe qui semble avoir été gelé, exsudation de gouttelettes de liquide à la surface du fruit.

Ces faits m'ont poussée à étudier l'action de diverses vapeurs sur le bleuissement et le brunissement de la pomme.

Le dispositif employé pour cette étude est des plus simples. Dans un poudrier, d'environ 150 cm³ de capacité, j'ai introduit le liquide ou le corps solide pulvérisé, dont je veux connaître l'action des vapeurs. Le flacon est fermé par un bon bouchon de liège, pourvu d'un crochet métallique, auquel, par l'intermédiaire d'un fil de coton, est suspendue une tranche de pomme. Le trou, destiné à

livrer passage au fil, a été pratiqué à l'aide d'une baguette de verre, très effilée à l'une de ses extrémités.

Tous les fragments de pommes ont sensiblement les mêmes dimensions, et il ont été prélevés dans les mêmes régions du fruit. Mes essais ont porté sur trois variétés de pommes : la Calville rouge, la Reinette du Canada, la Reinette grise. Leur durée a été de deux heures. Ils ont été effectués à une température de 15 à 18°.

Chaque série d'expériences a été faite en présence de fragments témoins suspendus dans des poudriers vides.

J'ai constaté que, dans ces conditions opératoires, le bleuissement par la teinture de gayac n'est pas empêché.

Je réunis dans le tableau suivant les résultats relatifs au brunissement.

VAPEURS DE :	CALVILLE rouge	REINETTE grise	REINETTE du Canada
Hydrocarbures			
Ether de pétrole	>	>	>
Essence de térébenthine	=	=	=
Benzène.	=	=	=
Toluène.	=	=	=
Alcools primaires			
Alcool méthylique	I	I	I
— éthylique.	>	>	>
— propylique	>	>	>
— butylique.	>	>	>
— amylique.	I	I	>
Alcool secondaire			
Alcool isobutylique	I	>	>
Alcool tertiaire			
Alcool butylique tertiaire	I	>	I
Cyclohexanol			
Menthol.	=	=	=

I brunissement très intense.

> — supérieur à celui du témoin.
= — comparable à celui du témoin.

VAPEURS DE :	Calville rouge	Reinette grise	Reinette du Canada
Alcool terpénique			
Géraniol	=	=	=
Diols			
Glycol	=	=	=
Aldéhydes			
Aldéhyde formique	=	=	=
— acétique	>	>	>
Citral	=	=	=
Aldéhyde benzoïque	=	=	=
Acétones			
Diméthylcétone	I	I	I
Camphre	=	=	=
Ether-oxyde			
Ether ordinaire	I	I	I
Ethers-sels			
Iodure d'éthyle	I	I	I
Acétate —	I	I	I
Butyrate —	I	I	I
Oxalate. —	=	=	=
Phénols			
Phénol ordinaire	=	=	=
Thymol	=	=	=
Créosote	=	=	=
Ether de Phénol			
Gayacol	=	=	=
Dérivé nitré			
Nitrobenzène	=	=	=
Amines aromatiques			
Aniline	=	=	=
Orthotoluidine	=	=	=

VAPEURS DE :	Calville rouge	Reinette grise	Reinette du Canada
Composés hétérocycliques azotés			
Pyridine	=	=	=
Quinoléine	=	=	=
Ether isosulfocyanique			
Isosulfocyanate d'allyle	>	>	>
Dérivés halogénés du Méthane			
Chloroforme	I	I	I
Tétrachlorure de carbone	>	>	>
Bromoforme	I	I	I
Composés divers			
Sulfure de carbone	I	I	I
Hydrate de chloral	=	=	=
Valérianate d'ammonium	>	>	>
Ammoniac	I	I	I

L'examen de ce tableau montre:

1° Qu'aucune des quarante vapeurs étudiées ne s'est opposée au brunissement;

2° Qu'elles se sont comportées sensiblement de la même façon vis-à-vis des trois variétés de pommes.

3° Que, d'après leur action sur le brunissement, on peut distinguer les vapeurs qui paraissent n'exercer aucune influence sur le phénomène, celles qui le favorisent et celles qui l'intensifient. Après deux heures d'exposition à l'action de ces dernières vapeurs, les fragments présentent sur presque toute leur surface la couleur 105 du Code des couleurs Kleincksieck et Valette (156).

4° Que quelques-unes de ces dernières vapeurs, non seulement, intensifient le brunissement, mais encore l'accélèrent. Avec les vapeurs d'éther, d'acétone, d'iodure de méthyle, d'alcools méthylique et éthylique, la couleur 105 du Code est obtenue en une heure, alors qu'avec les autres vapeurs, elle n'apparaît qu'en une heure et demie ou deux heures.

Doit-on rapporter cette intensification du brunissement à un groupement fonctionnel chimique spécial ? Non, semble-t-il, puisque les substances qui la déterminent appartiennent à des fonctions chimiques différentes.

B. — *Influence de quelques vapeurs saturantes, dans l'air raréfié.*

Dans une série d'expériences, j'ai étudié, en l'absence presque complète d'air atmosphérique, l'influence, à froid, de quelques-unes des vapeurs qui intensifient le brunissement.

J'ai adopté le mode opératoire suivant : sur un plan en verre dépoli, je pose le coupe-pomme représenté dans le dessin ci-joint. Cet instrument est armé et porte une demi-pomme pelée. Sur le plan sont posés un large cristalliseur contenant le liquide volatil et un manomètre barométrique. Tout ce dispositif est recouvert par une cloche de verre qu'on monte au suif. La cloche étant en relation avec une trompe à eau de Golaz, je pratique l'aspiration jusqu'à ce que la pression soit constante à l'intérieur de la cloche. Après une demi-heure, je fais un nouveau balayage, et je supprime l'aspiration quand la pression

intérieure est de nouveau constante. A ce moment, je sectionne la pomme.

Voici le détail d'une opération faite avec l'éther acétique: La pomme est sectionnée à dix heures, la pression intérieure est égale à $22 \text{ }^{\text{m}}/\text{m}$, la température est de 14° , et la tension maxima de la vapeur d'eau à 14° est de $11 \text{ }^{\text{m}}/\text{m}$ 9. A midi, les fragments de pomme contenus dans la cloche sont brun clair, le témoin à l'air est jaune pâle, la pression intérieure est de $38 \text{ }^{\text{m}}/\text{m}$.

A seize heures, soit six heures après le sectionnement, le fragment de pomme soumis à l'action des vapeurs sont d'un brun intense, — le témoin est jaune — la pression intérieure est de $50 \text{ }^{\text{mm}}/\text{m}$, alors que la température s'est élevée à 15° . Le niveau de l'éther acétique a baissé considérablement dans le cristalliseur.

J'ai obtenu une même intensification du brunissement dans des expériences faites avec de l'acétone, de l'éther ordinaire et de l'aldéhyde benzoïque.

Ces expériences montrent donc que les vapeurs étudiées sont susceptibles de provoquer, en présence d'une très faible quantité d'oxygène atmosphérique, un brunissement plus intense que celui observé sur les témoins laissés à l'air, dans les mêmes conditions de température.

De l'action exercée sur les graines de moutarde, et les feuilles de laurier-cerise, par les vapeurs de liquides susceptibles d'agir comme anesthésiques, M. R. Dubois conclut que : *ces vapeurs ne possèdent pas seulement la propriété de provoquer des mouvements, des déplacements de liquide dans les tissus organisés; mais qu'elles déterminent des déshydratations, et diverses altérations, qui paraissent être le résultat de dédoublements s'effec-*

tuant par un mécanisme analogue à celui des dissociations.

Il est vraisemblable d'admettre que le brunissement intense provoqué par certaines vapeurs, en l'absence presque complète d'oxygène atmosphérique, est dû à des transformations du contenu cellulaire sous l'influence de ces vapeurs et que des condensations sont plutôt à envisager que des oxydations.

C. — Influence de diverses vapeurs à la température d'ébullition des liquides générateurs.

Pour cette étude, j'ai utilisé un ballon en verre, muni d'une tubulure latérale, reliée à un réfrigérant de Liebig. Le ballon est fermé par un bouchon de liège que traverse un thermomètre à mercure. Le bouchon est pourvu d'un crochet métallique auquel on suspend le fragment de pomme par un fil de coton blanc.

Quand le liquide est en ébullition, je suspends la tranche du fruit dans le col du ballon, à une hauteur suffisante pour qu'elle ne soit pas atteinte par les projections du liquide.

La durée de l'action des vapeurs a été limitée à quinze minutes.

J'ai employé des liquides dont les vapeurs saturantes provoquent, à la température ordinaire, un brunissement intense de la pomme : éther ordinaire, alcools méthylique et éthylique, chloroforme, acétone, benzine, et éther acétique.

Les vapeurs d'éther ordinaire seules ne s'opposent ni au brunissement, ni au bleuissement.

Les vapeurs des autres liquides ont empêché le bleuissement et ont eu une action paralysante définitive sur le brunissement.

En effet, les tranches, débarrassées du liquide dont elles sont imprégnées, par expression entre des doubles de papier filtre, ne brunissent ni par exposition prolongée à l'air, ni par immersion dans l'eau.

Influence sur le bleuissement de la mastication prolongée et de l'imprégnation par la salive.

La mastication prolongée et l'imprégnation par la salive atténuent le bleuissement et le brunissement.

Influence du passage à travers les voies digestives d'un animal sur le bleuissement

Des cobayes ont été sacrifiés, après avoir été nourris exclusivement de pommes pendant quarante-huit heures et moins de deux heures après un de leurs repas.

Le contenu stomacal et le contenu intestinal de ces animaux n'ont pas été colorés en bleu par la teinture de gayac, ni avant, ni après neutralisation vis-à-vis de la phtaléine du phénol.

La disparition du bleuissement peut être dû, soit à la destruction des oxydases au cours de l'acte de la digestion, soit à la présence dans le contenu stomacal et dans le contenu intestinal de substances réductrices qui masquent les réactions oxydasiques.

Du rôle de l'oxygène dans le brunissement

M. Lindet a constaté que le brunissement des tranches,

du suc et de la pulpe de pomme s'accompagne d'une absorption d'oxygène et d'un dégagement d'anhydride carbonique.

La détermination des échanges gazeux qui accompagnent le brunissement est une opération très délicate.

Dans le cas de la pulpe et des tranches, les échanges gazeux peuvent avoir plusieurs causes : la respiration des tissus et les fermentations dues à des levures.

Je me suis proposé d'établir, par une technique simple, le rôle de l'oxygène dans le phénomène du brunissement. J'ai pensé que la technique la plus simple et la plus démonstrative serait de couper une pomme dans le vide.

Pour réaliser cette expérience, je me suis heurtée à des difficultés matérielles nombreuses. Il m'a fallu tout d'abord trouver un appareil permettant de couper la pomme dans la cloche à vide. Un premier modèle de coupe-pomme électrique a été établi sur le principe du piège à loup. Cet instrument imposait l'emploi d'une cloche volumineuse, dans laquelle il m'était impossible de faire des vides suffisants.

Un deuxième coupe-pomme fut construit, c'est celui qui m'a servi dans toutes mes expériences (1). Le dessin ci-joint permet d'en comprendre facilement le fonctionnement (2). Pour mes expériences, j'ai adopté les conditions opératoires suivantes :

La cloche est montée au suif, tous les joints sont sous l'eau. J'opère sur une moitié de pomme pelée. Cette techni-

(1) Ces deux appareils ont été fabriqués dans les ateliers de M. Couprie, rue Montesquieu, à Lyon.

(2) Le ballon et le tube se dirigeant vers le manomètre à air libre qui figurent sur ce dessin ne sont employés que dans les expériences avec l'hydrogène et l'anhydride carbonique.

que offre un double avantage: elle facilite, lors de l'aspiration, l'évacuation des gaz contenus dans le fruit, et elle permet d'avoir dans la cloche même un témoin du brunissement, car la surface de l'échantillon en expérience brunit pendant le temps nécessaire au montage de l'appareil.

La valeur de la pression intérieure est donnée par un baromètre à mercure fixé au coupe-pomme. Ce dispositif a été adopté pour réduire au minimum les causes de fuite.

La cloche étant montée, je fais le vide jusqu'à obtention d'une pression intérieure constante. Ce résultat atteint, je pratique encore l'aspiration pendant une demi-heure, dans le but de débarrasser la pomme de son atmosphère intérieure et le fruit est alors sectionné.

Les expériences réalisées forment trois séries qui se distinguent par leur durée, par la durée de l'aspiration une fois la pomme coupée, par la valeur de la pression obtenue à l'intérieur de la cloche, et enfin par l'appareil producteur du vide.

EXPÉRIENCES DE LA PREMIÈRE SÉRIE

Le vide a été obtenu à l'aide d'une puissante trompe à eau, l'aspiration a été pratiquée pendant toute la durée de l'expérience et la pression de l'air à l'intérieur de la cloche (abstraction faite de la tension de la vapeur d'eau) n'a jamais été inférieure à neuf millimètres de mercure.

Je ne décrirai que l'une des nombreuses expériences réalisées avec des pommes d'espèces différentes, toutes ces expériences ayant donné des résultats identiques.

EXPÉRIENCE DU 5 DÉCEMBRE 1919

On commence l'évacuation de la cloche à 8 heures; à 8 h. 10, la pression intérieure est constante. On a :

Pression intérieure	20 ^m / _m
Température	12°
Tension maxima de la vapeur d'eau à 12°	10 ^m / _m 6

A 8 h. 40, la pomme est sectionnée. La surface de section de la pomme perd peu à peu la couleur blanc vert qu'elle présente après la section; à 14 h. 50, elle est jaune pâle et celle du témoin est jaune brun.

Les résultats obtenus dans les expériences de cette première série permettent de conclure que, pour apparaître, le brunissement n'a besoin que d'une petite quantité d'oxygène.

Le fragment contenu dans la cloche se colore en bleu par la teinture de résine de gayac.

A l'air, au sortir de la cloche, il brunit plus vite et avec plus d'intensité que le témoin.

Des auteurs ayant signalé que, dans le vide, les tranches de pomme ne brunissent pas — sans indiquer toutefois les caractéristiques du vide qu'ils ont employé, — et les tranches de pomme ayant bruni légèrement dans mes expériences, j'ai supposé que ce résultat devait être attribué à l'insuffisance du vide utilisé.

J'ai alors décidé de remplacer la trompe à eau par une pompe susceptible de donner un meilleur vide et j'ai institué une nouvelle série d'expériences.

EXPÉRIENCES DE LA DEUXIÈME SÉRIE

Elles ont été réalisées aux Etablissements Léon Givaudan, à Lyon, chemin de Combe-Blanche, à l'aide d'une pompe à vide à double effet.

L'aspiration a été pratiquée pendant toute la durée de l'expérience, soit pendant six heures. La pression intérieure a varié de 6 à 7 ^m/_m, la température de 17 à 19°.

Les résultats obtenus dans toutes les expériences de cette série ont été identiques: six heures après le sectionnement, la surface de section des fragments contenus dans la cloche est incolore, alors que celle du témoin, laissé à l'air et coupé au même moment, est brune.

Le brunissement de la pomme est donc impossible quand la teneur de l'atmosphère en oxygène est inférieure à une certaine valeur et quand la durée de l'expérience ne dépasse pas certaines limites.

Les fragments de fruit sortis de la cloche bleuissent avec le gayac.

Dix-huit mois après ces expériences, j'ai décidé de refaire quelques essais comparatifs en utilisant une pompe à vide Gaiffe-Pilon, mue électriquement.

Une circonstance fortuite m'ayant obligée à prolonger le premier essai pendant vingt-quatre heures, j'ai pu enregistrer des résultats nouveaux et intéressants.

EXPÉRIENCES DE LA TROISIÈME SÉRIE

J'ai employé des pompes à vide Gaiffe-Pilon, que MM. les professeurs Grignard et Porcher ont très aimablement mises à ma disposition.

Les pressions intérieures obtenues ont été comprises entre 4 et 5 m/m ; les températures voisines de 22° . Chaque expérience a duré vingt-quatre heures. En raison de l'échauffement de la pompe, il n'a pas été possible de pratiquer l'aspiration pendant toute la durée des essais. La demi-pomme a été sectionnée dix minutes après la mise en marche de l'appareil et l'aspiration supprimée dix minutes après le sectionnement (1). La pression intérieure augmentant d'environ 1 m/m par heure, je la ramenaïs, d'heure en heure, à sa valeur primitive par quelques coups de pompe et ceci pendant douze heures. L'appareil était abandonné douze heures à lui-même; dans cet intervalle de temps, la pression intérieure remontait à 20-22 m/m suivant les expériences.

Les résultats obtenus au cours de ces essais sont remarquablement identiques.

Pendant les quatre premières heures, — pression intérieure comprise entre 4 et 6 m/m : pas de brunissement;

Entre quatre et huit heures, avec la même pression intérieure: apparition d'un léger jaunissement;

Après douze heures, avec la même pression intérieure: la coloration est sensiblement égale à celle des témoins laissés à l'air; .

Après vingt-quatre heures, la pression intérieure variant de 4 ou 6 m/m à 20 ou 22 m/m , la coloration est brune, plus intense que celle des témoins.

Après vingt-quatre heures de séjour dans la cloche, les

(1) Dès les premiers coups de pompe, on voit de nombreuses bulles de gaz venir éclater à la surface du fragment de pomme.

fragments semblent gelés, leur tissu cède facilement à la pression. Le brunissement est plus intense dans les parties superficielles que dans les parties profondes et il s'intensifie quand le fragment, sorti de la cloche, est mis à l'air.

La perte en eau subie par les quartiers de pomme pendant l'expérience est considérable. Dans mes essais, elle a atteint une valeur moyenne voisine de 45 pour 100.

De ces dernières expériences, il ressort :

1° Que la surface de section d'une pomme ne brunit pas quand ce fruit est maintenu pendant environ quatre heures dans de l'air atmosphérique dont la pression ne dépasse pas 6 m/m ;

2° Qu'un brunissement apparaît sur cette surface de section quand l'expérience a une durée suffisante et que la pression intérieure de l'atmosphère varie de 6 à 22 m/m ;

3° Qu'une pomme, maintenue vingt-quatre heures dans une atmosphère dont la pression varie de 6 à 22 m/m , subit une déshydratation intense.

Existe-t-il une relation entre le brunissement observé sur des pommes broyées ou coupées et le brunissement que présentent, après un temps plus ou moins long, des pommes subissant une déshydratation intense dans un vide très poussé ?

Ces deux brunissements s'accomplissent-ils suivant le même mécanisme, ou suivant des mécanismes différents ?

Ce sont là des questions auxquelles il ne semble pas possible d'apporter une réponse à l'heure actuelle.

Influence de l'oxygène pur sur le brunissement, à la température ordinaire.

Dans une cloche, montée comme celle utilisée dans les expériences précédentes, je fais le vide. Quand la pression intérieure est devenue constante, je fais circuler dans l'appareil, pendant deux heures, un lent courant d'oxygène pur.

Dans ces conditions opératoires, je n'ai observé ni accélération, ni accroissement du brunissement, comparable à l'accroissement observé, même dans le vide, toutes les fois que la pomme subit une déshydratation intense.

De l'influence de l'hydrogène et de l'anhydride carbonique sur le brunissement, en l'absence d'oxygène atmosphérique et à la température ordinaire.

On peut encore établir le rôle de l'oxygène dans le brunissement d'une façon, en quelque sorte indirecte, en étudiant l'action que d'autres gaz peuvent exercer sur des pommes coupées, en l'absence d'oxygène.

J'ai étudié l'influence de l'hydrogène et de l'anhydride carbonique.

Pour éviter toute intervention de l'oxygène, le gaz était produit, après élimination de l'air, à l'intérieur même de la cloche, par action d'une solution aqueuse d'acide sulfurique sur du zinc pour l'hydrogène, sur du bicarbonate de sodium pour l'anhydride carbonique.

Le métal ou le sel était contenu dans un cristalliseur

placé sous le coupe-pomme. La solution d'acide était enfermée dans un ballon et privée d'air par ébullition, et on scellait le ballon alors que la solution était en pleine ébullition. Un dispositif spécial permettait d'amener le liquide au contact du métal ou du sel. Ce dispositif est représenté sur le dessin ci-joint.

Les expériences ont été conduites de la façon suivante: On fait le vide dans la cloche et quand la pression intérieure est devenue constante, on brise la pointe du ballon à acide et on règle l'écoulement du liquide avec une pince. Quand des bulles de gaz s'échappent par la cuve à mercure du manomètre à air libre, on arrête l'écoulement de l'acide. On pratique une nouvelle aspiration, et on provoque un nouveau dégagement gazeux. Quand le gaz s'échappe par le manomètre, on sectionne la pomme, qu'on laisse deux heures dans une atmosphère d'hydrogène ou de gaz carbonique.

Après deux heures, la surface de section des pommes dans la cloche n'a pas bruni, alors que celle des témoins à l'air est brun clair.

De ces essais, il ressort que dans les conditions opératoires adoptées, en l'absence d'oxygène atmosphérique, une pomme ne brunit pas dans une atmosphère d'hydrogène ou d'anhydride carbonique.

De l'influence de quelques réducteurs sur le phénomène du brunissement et sur la matière brune produite.

L'étude de cette influence permet encore d'établir d'une façon indirecte le rôle de l'oxygène dans le brunissement

« normal » de la pomme. Je désigne sous ce nom le brunissement qu'une pomme coupée ou broyée subit à l'air.

J'ai constaté que de la pulpe de pomme broyée, soit avec une solution d'hydrosulfite de soude à 1 %, soit avec une solution de sulfite de soude à 5 % ne brunit pas.

De la pulpe, brunie à l'air, se décolore rapidement par addition de solution d'hydrosulfite de soude, plus lentement avec celle de sulfite ou sous l'influence de l'hydrogène naissant.

Puisque les réducteurs empêchent le brunissement et détruisent la matière brune formée, cette matière peut donc être considérée comme un produit d'oxydation.

Influence du brunissement sur l'acidité de la pomme

Le brunissement n'intéresse-t-il que la substance qui brunit, ou au contraire a-t-il une répercussion sur d'autres constituants de la pomme? Modifie-t-il, notamment, la valeur de l'acidité?

Pour répondre à cette dernière question, j'ai effectué une série de dosages sur des échantillons de pommes appartenant à des variétés différentes; j'ai déterminé, avec de la soude N/10, et vis-à-vis de la phtaléine du phénol, l'acidité de la pomme avant et après brunissement. La pulpe broyée était exposée à l'air pendant sept heures; pour éviter l'intervention des ferments figurés, elle était additionnée d'une goutte de chloroforme ou de toluène.

Il ressort des résultats obtenus que le brunissement ne semble exercer aucune influence sur l'acidité de la pomme.

Au cours de ces essais, j'ai constaté que, si on abandonne à l'air, en présence de toluène, de la pulpe neutralisée, elle peut, après un certain temps, fixer une nouvelle quantité d'alcali. Voici les résultats obtenus dans deux expériences effectuées sur cinq grammes de fruit :

	Pomme A	Pomme B
Volume de soude N/10 utilisé dans le dosage de l'acidité.....	3 cm 3 3	2 cm 3 8
Volume de soude N/10 fixé à nouveau après 2 heures.....	0,7	0,5
Volume de soude N/10 fixé à nouveau après 22 heures.....	0,6	0,8

M. Varcollier signale que « les acides ne sont pas répartis d'une façon uniforme dans la masse de la pulpe, et qu'on trouve une plus petite quantité d'acides à la périphérie qu'au centre » (88). Aussi, ai-je pris, dans ces expériences, toutes les précautions nécessaires pour obtenir des prises d'essais comparables entre elles.

Influence du brunissement sur la teneur de la pomme en sucres réducteurs.

J'ai dosé les sucres réducteurs, par le procédé G. Bertrand (157) dans des fragments de pommes non brunis, et sur des témoins brunis à l'air.

Le brunissement a été empêché par la chaleur.

Cinq grammes de pomme coupés en tranches minces sont projetés dans cinquante centimètres cubes d'eau distillée bouillante, préalablement additionnés de 0 gr. 50

de carbonate de chaux pour éviter l'hydrolyse des polysaccharides. Après cinq minutes d'ébullition, les fragments de pomme sont broyés dans un mortier en porcelaine avec le liquide d'ébullition. La bouillie obtenue est introduite dans un ballon jaugé de 100 cmc. et l'opération est conduite, à partir de ce moment, comme un dosage ordinaire de sucres réducteurs.

J'ai dosé les sucres réducteurs sur la pulpe broyée additionnée de toluène et brunie par une exposition de sept heures à l'air. Je réunis, dans le tableau suivant, les résultats obtenus dans quelques-uns des dosages effectués :

SUCRES RÉDUCTEURS RAPPORTÉS A 100 DE POMME					
[Avant brunissement			Après brunissement		
Pomme A.....	9 g. 30	en glucose.	9 g. 04	en glucose.	
— B.....	9 g. 46	—	9 g. 61	—	
— C.....	9 g. 25	—	9 g. 36	—	
— D.....	10 g. 33	—	10 g. 05	—	

Ces résultats permettent de conclure que le brunissement n'exerce pas d'influence sur la teneur en sucres réducteurs ou, du moins, qu'il n'exerce pas d'influence décelable par le procédé d'investigation utilisé.

De la nature du tanin contenu dans la pomme

Stiasny (93) a indiqué une réaction qui permet de séparer les tanins catéchiques d'avec les tanins galliques. Elle est basée sur la propriété que possèdent les tanins catéchiques de donner avec le formol, à chaud, en présence d'acide chlorhydrique, un produit de condensation insoluble.

Dans les mêmes conditions opératoires, les tanins galliques ne donnent pas de précipité.

J'ai utilisé cette réaction pour déterminer la nature du tanin de la pomme (1).

Le brunissement de plusieurs pommes a été empêché par la chaleur, en projetant ces fruits, coupés en tranches minces, dans une petite quantité d'eau bouillante. Après dix minutes d'ébullition, les tranches ont été réduites en bouillie par trituration au mortier avec le liquide d'ébullition. La masse, additionnée d'eau distillée jusqu'à obtention d'un liquide de consistance légèrement sirupeuse, est agitée avec du kaolin (0 gr. 30 par 50 c. de liqueur). On laisse en contact une heure et on filtre.

Au filtrat, j'ajoute par 50 cm³, 10 cm³ de solution de formol à environ 40 pour 100 et 5 cm³ d'acide chlorhydrique pur. Le mélange a été maintenu pendant une demi-heure à l'ébullition dans un ballon muni d'un réfri-gérant ascendant.

Dans ces conditions, il s'est formé un précipité volumineux, léger et d'un beau rouge. Le liquide, séparé du précipité par filtration, additionné de cinq grammes d'acétate de soude par 10 cm³, et de quelques gouttes d'une solution aqueuse d'alun de fer à 1 pour 100, ne se colore pas en noir bleu. Cet essai prouve la non-existence de tanin gallique dans la pomme.

Etant donné qu'à l'heure actuelle la réaction de Stiasny est considérée par les chimistes qui s'occupent

(1) C'est à M. Meunier, directeur de l'Ecole de tannerie lyonnaise, que je dois la connaissance de cette réaction.

de matières tannantes, comme la réaction spécifique la plus sensible des tanins catéchiques, les essais effectués permettent de conclure que le tanin de la pomme est un tanin catéchique exempt de tanin gallique.

En traitant, dans les mêmes conditions, des pommes brunies par exposition à l'air, j'ai obtenu un précipité qui est brun au lieu d'être rouge comme celui donné par les fruits non brunis. Il semble qu'on soit fondé à admettre que ce changement dans la coloration témoigne d'une transformation subie par le tanin pendant le brunissement:

Localisation du tanin

En traitant des coupes de pommes, non brunies, par les réactifs généraux des matières tannantes (perchlorure de fer, bichromate de potassium), nous avons constaté que le tanin est réparti dans toutes les cellules du parenchyme. Il apparaît plus abondant dans les cellules sous-épidermiques et dans les cellules voisines de l'endocarpe et des faisceaux libéro-ligneux. Les résultats de nos recherches histologiques confirment ceux obtenus par M^{lle} Mayoux (1).

Des coupes de pommes brunies ont montré la même proportion apparente de tanin, localisée dans les mêmes régions.

L'examen microscopique ne m'a donc pas permis de saisir les réactions chimiques qui s'accomplissent dans le contenu cellulaire lors du brunissement.

(1) MM. Bretin et Guilliermond ont bien voulu me diriger dans ces recherches.

CONCLUSIONS

Après une revue générale des principales acquisitions, faites au cours de ces dernières années, concernant les ferments solubles oxydants directs, en étudiant les réactions colorées que la pulpe de pomme donne avec des substances que ce fruit contient naturellement ou qu'on lui ajoute comme réactifs des oxydases, j'ai observé de mon côté que :

1° Les procédés généraux d'extraction et d'isolement sous forme concrète des oxydases végétales ne s'appliquent pas à celle de la pomme, et que celle-ci ne semble pas pouvoir être séparée de la pulpe;

2° Le bleuissement du gayac produit par la pulpe de pomme broyée avec l'eau est:

atténué quand on remplace ce liquide par les solutions de certains sels à titre suffisant, généralement supérieur à N/10;

empêché dans le cas des solutions N/10 d'oxalates et de fluorures, qui se rapprochent ici comme dans leur action empêchante sur divers phénomènes diastasiques;

rétabli dans un mélange où il était empêché par les solutions N/10 d'oxalates et de fluorurés, par précipitation de ces sels à l'aide d'une solution N/10 d'acétate de calcium ajoutée en léger excès;

empêché par une solution N/100 d'acide oxalique;

empêché par les solutions N/10 d'acides malique, oxalique, sulfurique, azotique, chlorhydrique;

empêché par les vapeurs, à la température de l'ébullition de certains liquides organiques qui bouillent au-dessus de 55°, mais non par ces vapeurs à la température ordinaire;

diminué par la mastication et l'imprégnation par la salive;

empêché par le passage à travers les voies digestives d'un animal ;

3° Le brunissement spontané du fruit broyé ou coupé, dont plusieurs auteurs ont constaté les relations étroites avec les réactions oxydasiques, est empêché par les mêmes agents physiques et chimiques que le bleuissement de la teinture de gayac et notamment par des solutions de sulfite et d'hydrosulfite de sodium à un titre suffisant.

4° Il est suspendu, pendant un temps plus ou moins long, dans une atmosphère où l'on fait une forte dépression — dépression dont on trouvera les caractéristiques dans le cours du travail — ou bien, dans une atmosphère dont on a chassé l'air par le vide combiné avec le balayage par un gaz inerte;

5° Un brunissement se développe avec une intensité

souvent considérable toutes les fois que la pomme subit une mortification [évaporation par séjour prolongé dans un vide très poussé, exsudation sous l'action à froid de vapeurs organiques (phénomène décrit par R. Dubois)], ou lorsqu'on soumet le fruit à l'action des alcalis dilués; — on ne peut se prononcer sur le mécanisme de cette intensification, dans laquelle des phénomènes chimiques d'oxydation et de condensation pourraient intervenir;

6° Un produit de condensation avec la formaldéhyde peut être obtenu, à partir du suc de pomme, par application de la technique d'isolement des tanins catéchiques de Stiasny, ce résultat confirme ceux que nous avons obtenus dans nos recherches histologiques;

7° La teneur en calcium, en manganèse et en fer de la pulpe de pomme peut faire soupçonner que ces métaux jouent un rôle dans les phénomènes oxydasiques observés.

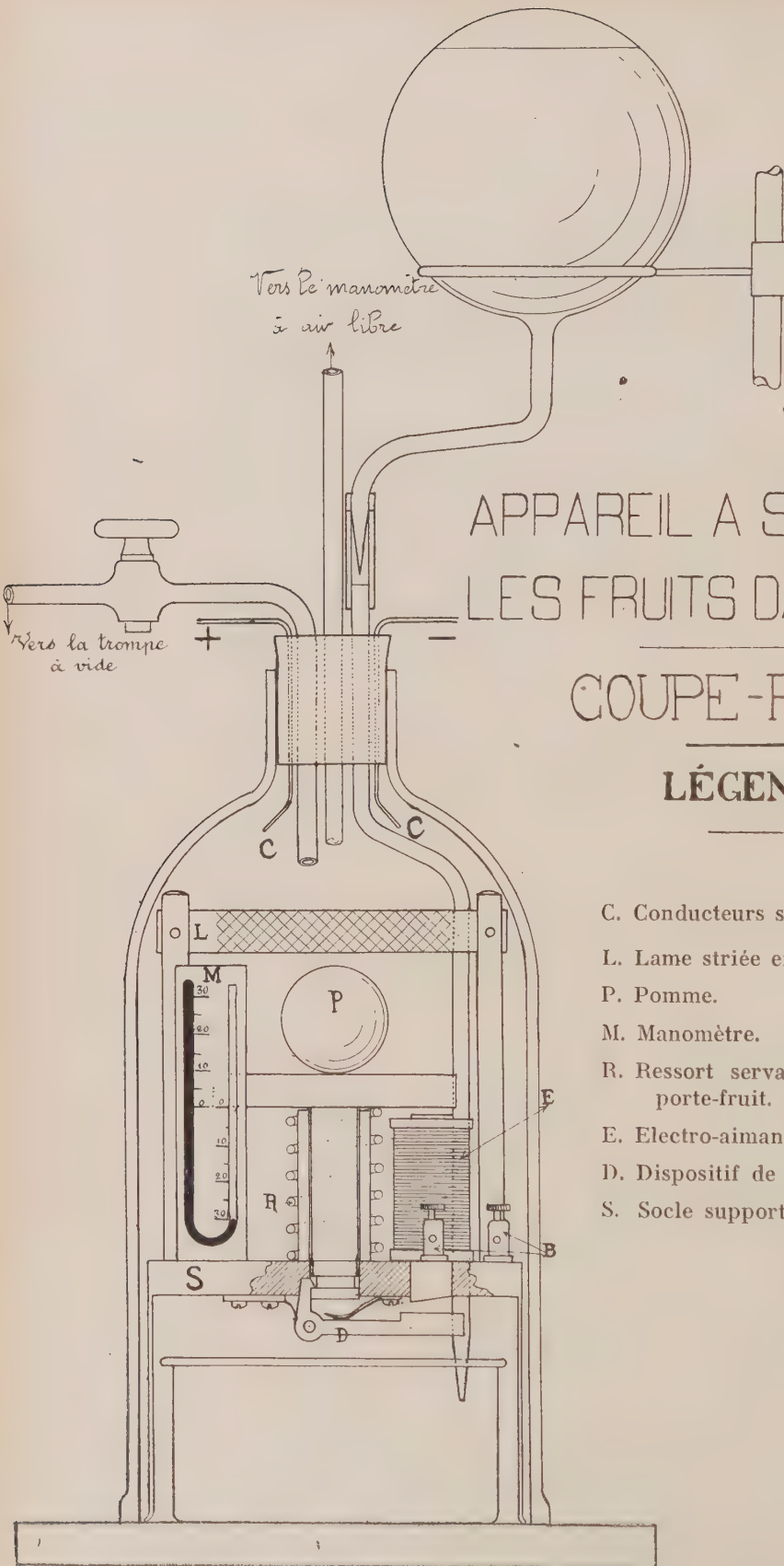
LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE,
ALBERT MOREL.

Vu :
LE DOYEN,
JEAN LEPINE.

Vu et permis d'imprimer :

Lyon, le 30 Juin 1921.

LE RECTEUR, PRÉSIDENT DU CONSEIL DE L'UNIVERSITÉ,
JOUBIN.



APPAREIL A SECTIONNER LES FRUITS DANS LE VIDE

COUPE-POMME

LÉGENDE

- C. Conducteurs se reliant aux bornes
- L. Lame striée en nickel.
- P. Pomme.
- M. Manomètre.
- R. Ressort servant à élever le plateau porte-fruit.
- E. Electro-aimant.
- D. Dispositif de déclenchement.
- S. Socle supportant l'appareil.

BIBLIOGRAPHIE

1. HOPPE-SEYLER. — *Med. Chem. Untersuchungen*, 1866, t. I, N° 133.
2. SCHÆNBEIN. — Ueber Ozon und Ozonwirkung in Pilzen, *J. f. prakt. Ch.* 1856, t. LXVII, p. 496.
3. TRAUBE. — *Theorie des Fermenturrkungen*, 1858.
4. CLAUDE BERNARD. — Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux. 1878, t. I, p. 160.
5. HIKOROKURO YOSHIDA. — *J^l of the chemical Society of London*, 1883, t. XLVIII, p. 472.
6. G. BERTRAND. — Sur la laccase de l'arbre à laque. *Ac. Sc.* 1894, t. CXVIII, p. 1.215.
7. G. BERTRAND. — Sur une nouvelle oxydase ou ferment soluble oxydant d'origine végétale. *Bull. Soc. Chim.*, 1896, t. XV, p. 793.
8. DUCLAUX. — *Traité de Microbiologie*, 1899, t. II, p. 566-737.
9. BACH. — Les ferments oxydants et réducteurs. Leur rôle dans le processus de la respiration. *Arch. Sc. Phys. N^lies*, 1913, t. XXXV, p. 240.
10. DE STÖCKLIN. — Contribution à l'étude de la peroxydase. *Thèse, Genève*, 1907.
11. GUILLEMINOT. — Les nouveaux horizons de la science. 1919, t. III, p. 141, 242 et suiv.

12. BATTELLI et M^{lle} STERN. — Nature des ferments oxydants et des ferments réducteurs. *Soc. Biol.*, 1920, t. XXXVI, p. 1.544.
13. BACH. — *Arch. Sc. Phys. N^{lles}*, 1910, t. XXXII, p. 37.
14. G. BERTRAND. — Guide pour les manipulations de chimie biologique. 1919, *Dunod et Pinat, édit., Paris*.
15. BACH. — Sur l'individualité des ferments oxydants et réducteurs. *Arch. Sc. N^{lles}*, 1915, t. XXXIX, p. 59.
- * 16. J. WOLFF. — Contribution à la connaissance de divers phénomènes oxydasiques naturels et artificiels. *Thèse Doctorat Université, Paris*, 1910.
17. G. BERTRAND et ROSEN BAND. — Recherches sur l'action paralysante exercée par certains acides sur la peroxydiastase. *Ann. Inst. Past.*, 1909, t. XXIII, p. 315.
18. WEYL. — Les méthodes de la chimie organique. (*Traduction R. Cornubert*), 1914, t. II, p. 344, *Dunod et Pinat, Paris*.
19. CHODAT et BACH. — *Herbier Boissier*, 1903, p. 76.
20. J. WOLFF. — Quelques propriétés nouvelles du catalyseur dit « Peroxydase ». Rapprochement entre son action et celle des nitrites. *Ann. Inst. Past.* 1913, N° 7, p. 554.
21. CHODAT et BACH. — Recherches sur les ferments oxydants. *Arch. Sc. Phys. N^{lles}*, 1904, t. XVII, p. 507.
22. LEW. — On catalase. *U. S. depart. of. agricult. Washington*, 1901, *Report*, 68.
23. P. SÉE. — Contribution à l'étude des applications thérapeutiques des oxydases et des métaux ferments, *Thèse doctorat Médecine, Paris*, 1905.
24. P. PORTIER. — Les oxydases dans la série animale. *Thèse doctorat Médecine, Paris*, 1897.
25. HENRIQUEZ et SICARD. — Les oxydations de l'organisme. p. 40. *Baillière, Paris* 1902.

26. HUNGER. — Oxydasesreaktion und Peroxydasen. *Ber-Bot, Ges.*, t. XIX, p. 374.
27. J. R. DUPOUY. — Étude des propriétés oxydantes de certains laits et remarques sur la résine de gayac comme réactif des agents d'oxydation. *Thèse, diplôme supérieur de pharmacien, Bordeaux*, 1897.
28. PIGHINI. — *Arch. di. Physiol.* IV, p. 57, I.
29. SARTORY. — Action de quelques sels sur la teinture de gayac. *Soc. Biol.*, 1911, t. LXX, p. 700.
Sur quelques réactions fournies par la teinture de gayac. *Soc. Biol.*, 1911, t. LXX, p. 895.
30. FOUARD. — Sur l'action catalytique exercée par les sels alcalins et alcalino-terreux dans la fixation de l'oxygène de l'air par les solutions de polyphénols. *Ac. Sc.*, 1906, t. CXLII, p. 796.
31. DONY-HÉNAULT. — Contribution à l'étude méthodique des oxydases. *Bull. Acad. roy. Belg., Classe des Sciences*, 1909, p. 349 et 353.
32. J. WOLFF. — Phénomènes d'oxydation et de réduction dans les tissus végétaux. *Ann. Inst. Past.*, 1917, t. XXXI, p. 92.
33. P. MAZÉ. — Recherche sur la présence de l'acide nitreux dans la sève des végétaux supérieurs. *Ac. Sc.*, 1912, t. CLV, p. 781.
34. MARINESCO. — Recherches histologiques sur les oxydases. *Soc. biol.*, 1919, t. CXXXII, p. 98.
35. G. BERTRAND. — Influence des acides sur l'action de la laccase. *Ac. Sc.*, 1907, t. CXLV, p. 340.
36. ACHALME. — Electronique et biologie, p. 573, 1913, *Mas-son et C^{ie}, éditeurs*.
37. J. SARTHOU. — Sur une oxydase retirée du Schinus molle. La schinoxydase. *J^e Ph^{ie} et Chim.*, 1900, VI, t. XI, p. 482.
— Du rôle que paraît jouer le fer dans la schinoxydase. *J^e Ph^{ie} et Chim.*, 1900, VI, t. XI, p. 583.

- Sur quelques propriétés de la schinoxydase. *J¹ Ph¹⁰ et Chim.*, VI, t. XII, p. 104.
38. J. SARTHOU. — Contribution à l'étude de la nature des oxydases. *J¹ Ph¹⁰ et Chim.*, 1901, VI, t. XII, p. 464.
39. CANTACUZÈNE. — *Soc. Biol.*, 1913, t. LXXIV, p. 633.
40. ROSENFELD. — *Pharm. Ins. Kayser. Mil. Pétersb.* 1916.
41. DE STÖCKLIN. — *Thèse*, p. 25.
42. TRILLAT. — Propriétés de solutions colloïdales organo-métalliques à base de manganèse. *Bull. Soc. Chim.* 1904, t. XXXI, p. 807.
43. J. WOLFF et DE STÖCKLIN. — Contribution à l'étude des enzymes oxydants. *Ann. Inst. Past.*, 1909, p. 841.
44. A. JOB. — Notice sur les travaux scientifiques de A. Job. *Introduction* p. 8, 1908, E. Privat, édit., Toulouse.
Glucose et carbonates de cérium; sur un nouveau mécanisme d'oxydation provoquée. *Ac. Sc.*, 1903, t. CXXXIV, p. 1052.
45. A. JOB. — Activité de quelques sels des terres rares comme excitateurs d'oxydation. *Ac. Sc.*, 1903, t. CXXXV, p. 45.
46. DONY-HÉNAULT. — Oxydases et diastases. *Rev. G^{1e} Sc. pu. et appl.*, 1909, p. 948.
47. FOUARD. — Sur une réaction du type oxydasique présentée par les composés halogénés des terres rares. *Ac. Sc.*, 1906, t. CXLII, p. 1.163.
48. COSSA. — *Ac. Sc.*, 1902, t. CXXXIV, p. 377.
49. SPITZER. — *Pflüg. Arch.*, 1897, Bd. 67; t. LXXI, p. 591.
50. EFFRONT. — Les Enzymes et leurs applications, p. 334; Gauthier-Villars, Paris.
51. WOKER (Mme). — *Ber. Chem. Ges.*, 1914, 47, 1.024.
52. J. BOURGAULT et P. ROBIN. — Oxydation catalytique par les corps non saturés (huiles, carbures, etc). *J¹ Ph¹⁰ et Chim.*, 1921, VII^e s., t. XIII, p. 49.

53. BACH. — *Arch. Sc. Phys.* N^{11es}, 1917, t. XXXXIII, p. 308.
54. BACH. — Synthèse de la tyrosinase. *Arch. Sc. Phys.* N^{11es}, 1909, p. 306.
55. BACH. — Du rôle des peroxydes dans les phénomènes d'oxydation lente. *Ac. Sc.*, 1897, t. CXXIV, p. 951.
56. BACH. — *Abderhalden'sche Biochem. Arbeits methoden*, p. 44.
57. ASO. — *Beichefte. z. bot. Centralblatt*, t. XV, p. 208.
58. LAURENT. — Expériences sur la réduction des nitrates par les végétaux. *Ann. Inst. Past.*, 1890, t. IV, p. 722.
59. STAUD. — *Thèse*, p. 14.
60. J. WOLFF. — Sur le mécanisme de quelques phénomènes d'oxydation et de réduction dans les tissus de la pomme et d'autres végétaux. *Bull. Soc. chim. biol.*, 1914, t. I.
61. BACH et CHODAT. — *Arch. Sc. Phys.* N^{11es}, t. XV.
62. BACH et CHODAT. — *Arch. Sc. Phys.* N^{11es}, t. XVII, p. 517, 1901.
63. ENGLER et ERZOG. — *Zeitsch. f. phys. chem.*, t. LXI, p. 327, 1909.
64. BATTELLI et M^{11e} STERN. — Mécanisme d'action des ferments oxydants. *Soc. Biol.*, 1921, t. III, p. 102.
65. J. WOLFF. — *Thèse*, p. 80.
66. V. STAUB. — Nouvelles recherches sur la tyrosinase. *Thèse doctorat sciences*, Genève, 1908.
67. ACHALME. — Influence de la viscosité du milieu sur les actions diastasiques. *Ac. Sc.*, 1911, t. CLII, p. 1.358.
68. GESSARD. — Etude sur la tyrosinase. *An. Inst. Past.*, 1901, t. XV, p. 606.
69. AGULHON. — Action des rayons ultra-violet sur les diastases. *Ac. Sc.*, t. CLIII, p. 398.

70. AGULHON. — Sur le mécanisme de la destruction des diastases par la lumière. *Ac. Sc.*, 1991, t. CLIII, p. 979.
— Action de la lumière sur les diastases, *Ann. Inst. Past.*, 1912, t. XXVI, p. 38.
71. G. BERTRAND. — Recherche sur l'influence paralysante exercée par certains acides sur la laccase. *Ann. Inst. Past.*, 1907, t. XXI, p. 673.
72. J. WOLFF. — Thèse, p. 82.
73. J. WOLFF. — Thèse, p. 79.
74. G. BERTRAND. — Sur le bleuissement de certains champignons du genre *Boletus*. *Ann. Inst. Past.*, 1902, t. XVI, p. 179.
75. J. WOLFF. — Relation entre les phénomènes oxydasiques naturels et artificiels. *Ann. Inst. Past.*, 1910, t. XXIV, p. 788.
76. MIRANDE. — Influence exercée par certaines vapeurs sur la cyanogénèse végétale. *Ac. Sc.*, 149-p. 140, 1909.
77. H. COUSIN et H. HÉRISSEY. — Oxydation du thymol par le ferment oxydant des champignons. *Soc. Biol.*, 1907, t. LXIII, p. 471.
78. BACH. — *Arch. Sc. Phys. N^{lles}*, 1917, t. XLIII, p. 211.
79. J. WOLFF. — De l'action excitante des alcalis, en particulier de l'ammoniaque sur la peroxydase. *Ac. Sc.*, 1912, t. CLV, p. 484.
80. DONY-HÉNAULT et Mlle VAN DUUREN. — Contribution à l'étude méthodique des oxydases dans les tissus animaux. *Bull. Acad. roy. Belg.*, 1907, p. 537.
81. G. BERTRAND. — Rapport entre la composition chimique des composés organiques et leur oxydabilité sous l'influence de la laccase. *Bull. Soc. chim.*, 1896, t. XV, p. 791.
82. G. BERTRAND. — Sur l'oxydation du gayacol par la laccase. *Ac. Sc.*, 1903, t. CXXXVII, p. 1.269.
83. J. WOLFF. — Nouvelles analogies entre les oxydases artificielles et les oxydases naturelles. *Ac. Sc.*, 1909, t. CXLVIII, p. 501.

84. G. BERTRAND et MARTINAND. — *An. agron.*, 1896, p. 130.
85. DONY-HÉNAULT. — Contribution à l'étude méthodique des oxydases. *Bull. roy. acad. Belg.*, 1908, p. 160.
86. G. BERTRAND. — Voir 71 et 35.
87. GESSARD. — Sur les réactions des oxydases avec l'eau oxygénée. *Soc. biol.*, 1903, p. 637.
88. G. WARCOLLIER. — Pomologie et cidrerie. *Encyclopédie agricole*, Baillière.
89. BIERDERMANN. — *Pflügers Archiv. für Physiol.*, 72, 1898, S, 151.
90. DEWITZ. — Action des oxydases sur la métamorphose des insectes, 1902, t. LIV, p. 45.
91. FURTH et SCHNEIDER. — Hofmeisters Beiträge, zur chemischen Physiologie und Pathologie, t. I, p. 229.
92. GESSARD. — Sur la tyrosinase de la mouche dorée. *Ac. Sc.*, 1904, t. CXXXIX, p. 644.
93. STIASNY. — *Der Gerber*, 1905, p. 186 et 748.
— *Collegium*, 1911, p. 323 et 475.
— *Collegium*, 1912, p. 484.
94. G. BERTRAND et MUTTERMILCH. — *Bull. Sc. Pharm.*, 1907, p. 437.
95. CHODAT. — Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. *Arch. Sc. Phys. N^{lles}*, 1907, t. XXIII, p. 427.
96. BACH et Mlle MARYANOVITCH. — Contribution à l'étude des phénomènes de spécificité de l'action de la phénolase. *Arch. Sc. Phys. N^{lles}*, 1912, t. XXXIII, p. 483.
97. BOURQUELOT. — Sur les propriétés de quelques solutions aqueuses chloroformées de ferment oxydant des champignons sur la durée de l'activité de ces solutions. *Soc. Biol.*, 1896, t. XLVIII, p. 893.
— Durée de l'activité des ferments oxydants des champignons en solution dans la glycérine. *Soc. Biol.*, 1897, t. II, p. 454.
98. BACH. — Mode d'action de la tyrosinase. *Arch. Sc. Phys. N^{lles}*, 1908, t. XXV, p. 515.

99. CHODAT. — *Arch. Sc. Phys.* N^{11es}, 1915, t. XXXIX, p. 329.
100. GONNERMANN. — Homogintisinsäure. *Archiv. für die gesamm physiol.*, vol. LXXXII, 1900.
101. CHODAT et STAUB. — *Arch. Sc. Phys.* N^{11es}, 1907, t. XXIII, p. 866.
102. HAEHN. — *Biochem. Zeitsh.*, 1920, t. CV, p. 169, d'après *J¹ de Ph^{1e} et de Chim.*, 1921.
103. GESSARD. — Sur la tyrosinase. *Ac. Sc.*, 1900, t. CXXX, p. 1327.
104. G. BERTRAND et ROSENBLATT. — Sur la tyrosine racémique. *Ann. Inst. Past.*, 1908, p. 425; *Ac. Sc.*, 1908, t. CXLVI, p. 304.
105. G. BERTRAND. — Recherches sur la mélanogénèse; action de la tyrosinase sur divers composés voisins de la tyrosine. *Bull. Sc. pharm.*, 1908, p. 65.
106. — CHODAT. — Nouvelles recherches sur les ferments oxydants. *Arch. Sc. Phys.* N^{11es}, 1907, t. XXIV, p. 187.
107. STAUB. — *Thèse*, p. 33.
108. CHODAT. — *Arch. Sc. Phys.* N^{11es}, 1907, 1912, 1915.
109. CHODAT et SCHWEIZER. — *Arch. Sc. Phys.* N^{11es}, 1913, t. XXXV, p. 348.
110. HOFMEISTER. — Ueber bildung der Harmstoffe durch oxydation. *Arch. f. experim. pathol.*, 1894, t. XXXIII, p. 198.
111. HARLAY. — De l'application de la tyrosinase, ferment oxydant du *Russula delica*, à l'étude des ferments protéolytiques. *Thèse, doct. en pharm.* Paris, 1900.
112. STAUB. — *Thèse*, p. 27 et suiv.
113. BOURQUELOT. — Ferments solubles oxydants et médicaments. *J¹ Ph^{1e} et Chim.*, 1896, t. IV, p. 440.
— Des composés oxydables sous l'influence du ferment oxydant des champignons. *Ac. Sc.*, 1896, t. CXXIII, p. 315.

114. CHODAT. — *Arch. Sc. Phys.* N^{11es}, 1912, t. XXXIII, p. 232.
115. CHODAT. — *Arch. Sc. Phys.* N^{11es}, 1909, p. 90.
116. G. BERTRAND et ROSENBLATT. — Sur la température mortelle des tyrosinases végétales. *Bull. Soc. Chim.*, 1910, t. VII, p. 557.
117. LINOSSIER. — De la résistance au vieillissement de la peroxydase et de la catalase. *Soc. Biol.*, 1916, p. 1.145.
118. BACH. — *Arch. Sc. Phys.* N^{11es}, 1913, t. XXXV, p. 348.
119. AGULHON. — Influence de l'acide borique sur les actions diastasiques. *Ac. Sc.*, 1909, t. CXLVIII, p. 1.340.
120. J. WOLFF. — Analogie entre les oxydases naturelles et les oxydases artificielles. *Ac. Sc.*, 1910, t. CI, p. 477.
121. CHODAT et FREDERICKS. — *Arch. Sc. Phys.* N^{11es}, 1909, t. XXVII, p. 90.
122. GESSARD. — Sérum antioxydasique polyvalent. *Ac. Sc.*, 1906, t. CXLII, p. 641.
123. GESSARD. — Sur les oxydases de Seiches. *Ac. Sc.*, 1903, t. CXXXVI, p. 631.
124. GESSARD. — Sur la formation des pigments mélaniques dans les tumeurs du cheval. *Ac. Sc.*, 1903, t. CXXXVI, p. 1.086.
125. G. BERTRAND et MUTTERMILCH. — Sur le phénomène de coloration du pain bis. *Bull. Sc. Pharm.*, 1907, p. 501.
126. VAN DER HAAR. — *Bisch. ZEIT.*, t. CXIII, p. 19, 1921.
d'après *Bull. Soc. Chim.*, 1921, juin, p. 646.
127. J. WOLFF. — *Thèse*, p. 59.
128. HÉRISSEY. — Sur la conservation du ferment oxydant des champignons. *Soc. Biol.*, 1919, p. 798.
129. LERAT. — Sur l'oxydation de la vanilline par le ferment oxydant des champignons et de la gomme arabique. *J' Ph^{1e} et Chim.*, 1904, t. I, p. 10.

130. BOUGAULT. — Oxydation de la morphine par le suc de *Russula delica*. *J¹ Ph^{1e} et Chim.*, 1902, t. XVI, p. 49.
131. BOURQUELOT. — Les incompatibilités de la gomme arabique dues à ses propriétés oxydantes. *J¹ Ph^{1e} et Chim.*, 1904, t. XIX, p. 473-524.
132. TANZI. — *Bulletin des Sociétés de Pharmacie du Sud-Ouest et du Centre*, avril 1902.
133. CAZENEUVE. — Ferment oxydant solublé dans la casse des vins. *Ac. Sc.*, 1897, t. CXXIV, p. 406.
— Sur le ferment oxydant de la casse des vins. *J¹ Ph^{1e} et Chim.*, 1897, t. V, p. 273.
134. GOUIRAND. — Présence d'une diastase dans les vins cassés. *Ac. Sc.*, 1895, t. CXX, p. 887.
135. LINDET. — Sur l'oxydation du tanin de la pomme à cidre. *Ac. Sc.*, 1895, t. CXX, p. 370.
— Ferment soluble de la pomme à cidre. *Bull. Soc. chim.* 1895, t. XIII, p. 280.
136. GRUSS. — *Weich f. Brauer*, XVI, p. 529.
137. ROUX (G.). — Sur une oxydase productrice de pigment sécrétée par le coli-bacille. *Ac. Sc.*, 1899, 128, p. 693.
138. TOLOMEI. — Sopra uno fermente solubili che si trova nel vino. *Atti della Reale Accademia dei Lincei*, Rendiconti Roma, t. V, 52.
139. R. DUBOIS. — Sur la luciférase ou zymase photogène des animaux et des végétaux. *Ac. Sc.*, 1896, t. CXXIII, p. 653.
140. BATTELLI et M^{11e} STERN. — L'alcoolase et les tissus animaux. *Soc. Biol.*, 1909, t. LXVII, p. 419.
— Production d'aldéhyde dans l'oxydation de l'alcool par l'alcoolase des tissus animaux. *Soc. Biol.*, 1910, t. LXVIII, p. 5.
141. BATTELLI et M^{11e} STERN. — L'Uricase dans les différents tissus animaux. *Soc. Biol.*, 1909, t. LXVI, p. 612.
— Les échanges gazeux produits par le ferment

- uricolytique. *Soc. Biol.*, 1909, t. LXVI, p. 411 et 612.
142. BATTELLI et Mlle STERN. — Dégénération des hydrates de carbone dans l'organisme animal. *Ac. Sc.*, 1903, t. CXXXVI, p. 1.351
143. G. BERTRAND. — *Archives de physiologie*, 1896, p. 23.
144. MEDWEDEW. — *Archiv. für Physiologie*, 1901, t. LXXXVI, p. 540.
145. ABELOUS et ALOY. — Sur l'existence dans l'organisme animal d'une diastase à la fois oxydante et réductrice. *Soc. Biol.*, 1903, t. XV, p. 1.355. — *Soc. Biol.*, 1908, t. XV, p. 891.
146. BATTELLI et Mlle STERN. — Dédoublément de l'aldéhyde salicylique en acide salicylique et saligénine par les tissus animaux. *Soc. Biol.*, 1910, t. LXIX, p. 162.
147. G. BERTRAND. — Recherche et dosage de petites quantités de manganèse, en particulier dans les substances organiques. *Bul. Soc. Chim.*, 1911, t. I, p. 361.
148. BOURQUELOT. — Action d'un ferment soluble hydratant et d'un ferment soluble oxydant. *Soc. Biol.*, 1896, XLVIII, p. 314.
149. SCHMIEDEBERG. — *Archiv. für exp. path. et pharm.*, 1876, t. VI, p. 233. — 1881, t. XIV, p. 288 et 379.
150. LINDET. — Sur le tanin colorant de la pomme. *Le Cidre*, revue mensuelle du Poiré et du Cidre, 1893, N 4, p. 150.
151. D^r A. MOREL. — *Précis de technique chimique*, 1909, p. 212.
152. I. EWART. — Etude comparative de l'oxydation par les catalyseurs organiques et inorganiques. *Proceedings of the royal Society of London. Series B*, 1915, p. 285.

153. M^{me} ONSLOW. — Oxidising enzymes. *The biochemical journal*, vol. XIII, N° 1, 1919, mai.
— Oxidising enzymes.
The oxidising enzymes of some common fruits. *The biochemical journal*, vol. XIV, N° 5, 1920, octobre.
— Oxidising enzymes, *The biochemical journal*, vol. XV, N° 1, 1921.
154. J. WOLFE. — Sur la présence, dans un grand nombre de végétaux, d'un diphenol présentant de grandes analogies avec la pyrocatechine. *Ann. Inst. Past.*, 1917, t. XXXI, p. 92.
155. R. DUBOIS. — Recherches préliminaires sur le mode d'action de quelques liquides organiques neutres sur la substance organisée. *Soc. Biol.*, t. V, 1883.
— Expériences relatives à l'action de quelques liquides organiques neutres sur la substance organisée. *Soc. Biol.*, 1883, p. 100.
— Notes sur l'action des vapeurs de quelques liquides organiques sur la substance organisée. *Atmolyse et atmolyseur.* *Ac. Sc.*, 1911, t. CLIII, p. 1.180.
156. KLEINCKSIECK et VALETTE. — Code des Couleurs, 1908. *Kleincksieck*, éditeur, 3, rue Corneille, Paris.
157. G. BERTRAND. — Le dosage des sucres réducteurs. *Sc. Pharm.*, 1907, p. 7.
158. AGULHON. — Recherche sur la présence et le rôle du bore dans les végétaux. *Thèse Doctorat ès Sciences*, 1910, Paris.
-

ABREVIATIONS

Ac. Sc. — Comptes rendus de l'Académie des Sciences de Paris.

An. Agron. — Annales agronomiques.

Ann. Inst. Past. — Annales de l'Institut Pasteur.

Arch. Sc. Phys. N^{lles}. — Archives des Sciences physiques et naturelles de Genève. — Bureau des Archives, rue de la Pélisserie, 18, Genève.

Bull. Soc. Chim. — Bulletin de la Société chimique de France. Avant 1907, cette revue portait le nom de : *Bulletin de la Société chimique de Paris*.

Bull. Soc. Chim. Biol. — Bulletin de la Société de Chimie biologique.

Soc. Biol. — Comptes rendus hebdomadaires des séances et mémoires de la Société de Biologie.

Bull. Sc. Pharm. — Bulletin des Sciences pharmacologiques.

Bull. Acad. roy. Belg. — Bulletin de l'Académie royale de Belgique. (Section des Sciences).

J^l Ph^le et Chim. — Journal de Pharmacie et de Chimie.

Rev. g^le Sc. pu. et appl. — Revue générale des Sciences pures et appliquées.



